

*EIN VERGLEICH
VON ZWEI VERSCHIEDENEN MIKROMETHODEN
ZUR BESTIMMUNG VON AMINOGLYKOSIDEN
UND IHRE KLINISCHE VERWENDUNG*

Christa Seibold

1980

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

AUS DER KINDERKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr.med. Betke

Abteilung für antimikrobielle Therapie

Leiter: Professor Dr.med. Marget

EIN VERGLEICH VON ZWEI VERSCHIEDENEN MIKROMETHODEN
ZUR BESTIMMUNG VON AMINOGLYKOSIDEN UND IHRE
KLINISCHE VERWENDUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christa SEIBOLD
aus München

München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. MARGET

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. K. BETKE

Dekan: Prof. Dr. med. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1980



Inhaltsverzeichnis

(A) Einleitung	S. 1
(B) In der Klinik übliche Methoden zur Erfassung der Aminoglykosidkonzentrationen im Serum und anderen Körperflüssigkeiten	S. 3
(I) Mikrobiologische Methoden	S. 3
(II) Nicht-Mikrobiologische Methoden	S. 6
(C) Beschreibung der während unserer Vergleichsstudie angewandten Methoden	S. 10
(D) Ergebnisse	S. 20
(E) Diskussion	S. 28
(I) Quantitative Beurteilung beider Methoden	S. 28
(II) Qualitative Beurteilung beider Methoden	S. 35
(III) Noch ungeklärte Fragen	S. 39
(IV) Zusammenfassung der Diskussion	S. 43
(F) Zusammenfassung	S. 45
Anhang	S. 46
Literaturverzeichnis	S. 58

Ein großer Fortschritt in der Bekämpfung gram-negativer Infektionen war die Entwicklung der Aminoglykosid-Antibiotika. Bereits bei der Anwendung des ersten Aminoglykosids, des Streptomycin -es wurde 1943 von S.A.Waksman aus *Streptomyces griseus* isoliert und zur Behandlung der Tuberkulose eingesetzt- , zeigten sich die für alle Vertreter dieser Gruppe typischen Nebenwirkungen: Ototoxizität und Nephrotoxizität. Nach der Entdeckung weiterer Aminoglykoside und auf Grund der geringen therapeutischen Breite dieser Antibiotika hat man sich bemüht, Methoden zur Bestimmung der Aminoglykosid-Spiegel zu entwickeln, um den Patienten, die mit diesen Chemotherapeutika behandelt werden müssen, eine adäquate und damit effektive Dosierung gewährleisten zu können. In der Universitätskinderklinik München werden Aminoglykoside in der Therapie gram-negativer Infektionen häufig angewandt, wobei eine mikrobiologische und seit 1 Jahr auch eine nicht-mikrobiologische Methode zur Ermittlung der Serumkonzentration der Aminoglykosid-Antibiotika herangezogen werden können: es handelt sich um den Mikrotiter-Test und die acetylierende radioenzymatische Methode. Ziel meiner Arbeit war ein Vergleich beider Methoden in Bezug auf ihre Spezifität, Empfindlichkeit, Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Kosten und unter Berücksichtigung pädiatrischer Probleme.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551913_0082

(A) Einleitung

Bei den Antibiotika der Aminoglykosid-Gruppe handelt es sich um basische Oligosaccharide mit einem Wirkungsoptimum bei pH 5-9. Auf Grund ihrer chemischen Verwandtschaft sind bakterielles Spektrum, Verhalten im Organismus und Toxizität qualitativ gleich, quantitativ jedoch verschieden. Die Toxizität betrifft in erster Linie die Nierenfunktion, das Gehör und den Gleichgewichtssinn. So hat es sich gezeigt, daß Kanamycin und auch Amikacin sich zuerst auf das Gehör schädigend auswirken können, bei Gentamicin treten in der Regel Nephrotoxizität und vestibuläre Störungen vor Gehörschäden auf. Diese toxischen Nebenwirkungen treten relativ häufig bei einer bereits bestehenden Niereninsuffizienz auf, da es bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion zu einer Kumulation der Aminoglykoside im Organismus kommt. Weitere Eigenschaften dieser Antibiotika sind ihr breites Wirkungsspektrum, besonders gegenüber gram-negativen Keimen, ihr bakterizider Wirkungstyp, die rasche Resorption nach i.m. Gabe und die unveränderte Ausscheidung über die Nieren durch glomeruläre Filtration. Es sind heute rund 50 Aminoglykoside verschiedener chemischer Struktur bekannt, jedoch findet nur eine begrenzte Zahl in der Klinik Anwendung. Einige der in der Klinik üblichen Chemotherapeutika dieser Gruppe sind in Tabelle I S.46 und ihre gemeinsamen Eigenschaften in Tabelle II S.48 im Anhang zusammengefaßt. Bei Infektionen Neugeborener mit gram-negativen Keimen wird bevorzugt Tobramycin oder Amikacin appliziert, wobei letzteres sich durch ein breites Wirkungsspektrum (das im Gegensatz zur Muttersubstanz Kanamycin auch *Pseudomonas aeruginosa* umfaßt) auszeichnet und antibakterielle Wirksamkeit gegenüber Gentamicin-, Tobramycin- oder Sisomicin-resistenten, gram-negativen Erregern aufweist. Ältere Kinder werden auch mit Gentamicin, Sisomicin oder anderen Vertretern dieser Anti-

biotika-Gruppe behandelt. Entscheidend für die Wahl eines bestimmten Aminoglykosids ist die Kenntnis vom Resistenz- bzw. Empfindlichkeitsspektrum des der Infektion zugrunde liegenden Keimes gegenüber verschiedenen Vertretern dieser Chemotherapeutika. So sollen wiederholte Bestimmungen der Erregerempfindlichkeit -z.B. bei einem Patienten mit ausgedehnten Verbrennungen- vor der Gabe eines therapeutisch unwirksamen Antibiotikums schützen.

Als nächstes stellt sich die Frage, warum die Bestimmung der Aminoglykoside während der Therapie dringend erforderlich und wünschenswert ist. Hierfür lassen sich 3 Gründe finden: (a) Wie bereits erwähnt werden diese Chemotherapeutika ausschließlich glomerulär filtriert, was bei einer Einschränkung der Nierenfunktion (z.B. im Schock) zu einem Anstieg der Konzentration im Blut und Gewebe führt, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten toxischer Nebenwirkungen erhöht.

(b) Penicilline dürfen im Gegensatz zu Aminoglykosiden in einer hohen Dosis gegeben werden, da sie unter normalen Umständen praktisch untoxisch sind und keine ernsthaften Nebeneffekte hervorrufen. Bei den Aminoglykosiden hingegen liegen therapeutisch wirksame und toxische Dosis sehr nahe beieinander, so daß es schnell zu einer Über- oder Unterdosierung kommen kann. Die Folgen können zum Teil irreversible ototoxische und nephrotoxische Schäden sein, in seltenen Fällen treten allergische Reaktionen in Form der Eosinophilie auf, eventuell finden sich anaphylaktoide Effekte mit den entsprechenden Auswirkungen für das Herz-Kreislauf-System, neurologische Erscheinungen und neuromuskuläre Blockade mit Atemstillstand können weitere seltene Nebenwirkungen sein.

(c) Als letztes sei noch auf die Risiken einer zu geringen Dosierung der Aminoglykosid-Antibiotika hingewiesen. Wenn man nicht berücksichtigt, daß es bei einem unter Aminoglykosid-The-

rapie stehenden Neugeborenen von Tag zu Tag zu einer zunehmend besseren renalen Ausscheidung für diese Antibiotika kommt und die Möglichkeit einer raschen Kontrolle der Serumspiegel fehlt, wird man das Medikament unterdosieren und somit die Erkrankung nicht sicher therapeutisch beeinflussen können.

Eine Kontrolle der Blutspiegel ist im Rahmen einer Aminoglykosid-Therapie also sinnvoll und wenn möglich durchzuführen, um z.B. einem Patienten mit beginnender Niereninsuffizienz oder einem septischen Schock eine optimale Behandlung zuteil werden zu lassen. Die Methoden zur Erfassung der Blutspiegel sollten einfach, schnell durchführbar, ausreichend empfindlich und spezifisch sein und -was ein wichtiger Gesichtspunkt für eine pädiatrische Klinik ist- nur geringe Mengen Untersuchungsmaterial erforderlich machen.

(B) In der Klinik übliche Methoden zur Erfassung der Aminoglykosidkonzentrationen im Serum und anderen Körperflüssigkeiten.

In diesem Abschnitt möchte ich die einzelnen, in der Klinik gebräuchlichen Testverfahren mit ihren Vor- und Nachteilen kurz charakterisieren. Eine Übersicht über die in klinischen Labors üblichen Methoden zur Bestimmung der Aminoglykoside findet sich in Tabelle III S.49 im Anhang.

(I) MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

(1) Agardiffusionstest

Der Agardiffusionstest ist einer der am häufigsten angewandten klinischen Tests, da er einfach, billig und nach Reeves (3) unter standardisierten Bedingungen auch äußerst zuverlässig zu sein scheint. Broughall (4) gibt folgende Ratschläge für die Durchführung des Agardiffusionstests: Es ist darauf zu achten, den Agar gleichmäßig dick zu gießen, wobei eine Wasserwaage zu Hilfe genommen werden kann, Standards und Proben auf der-

selben Platte anzusetzen und randomisiert zu verteilen, d.h. Standards und Proben sollen zur Erhöhung der Genauigkeit der Meßergebnisse nicht in fester Reihenfolge auf die Platte gegeben werden. Die Hemmzonen dürfen sich nicht überschneiden und sie sollen nicht zu nahe am Rand liegen, wo die Agardicke variieren kann und der sog. "Randeffekt" auftritt, d.h. hier findet man eine größere Hemmzone im Vergleich zur Plattenmitte bei ein- und derselben Antibiotika-Konzentration. Die Zeit, in der man ein Ergebnis erhält, ist abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit des Chemotherapeutikums in den Agar und von der Wachstumsgeschwindigkeit des Indikatorstammes. So liefern einige Klebsiella-Stämme bereits nach 3-4 Stunden oder noch früher (26) brauchbare Ergebnisse, doch muß in der Regel über Nacht inkubiert werden und das Ergebnis liegt erst am nächsten Morgen vor. Das Ablesen der Hemmzonen ist einer der schwächsten Punkte dieser Methode und es sollte hierfür ein kalibriertes Meßgerät vorhanden sein. Auch können andere Antibiotika interferieren und dem Labor muß daher vom behandelnden Arzt unbedingt mitgeteilt werden, welche Medikamente zusätzlich appliziert wurden, um diese inaktivieren zu können oder einen Stamm zu wählen, der selektiv resistent ist, wobei man aber sehr aufpassen muß, daß kein ungeklärter Synergismus vorhanden ist, so wie z.B. ein Synergismus von Gentamicin mit Carbenicillin, vor allem für *Pseudomonas aeruginosa*, besteht. Bei einem Vergleich von Agardiffusionstest und acetylierender radioenzymatischer Methode fanden Broughall und Reeves (3) eine relativ gute Korrelation von $r=0,959$, was auf die Einhaltung der oben erwähnten Standardbedingungen zurückzuführen ist.

Als Variante der Agardiffusion ist die vertikale Diffusion anzusehen (17), auf die in diesem Rahmen nicht näher eingegangen werden soll.

(2) Reihenverdünnungsmethoden

Beim Reihenverdünnungstest wird eine Verdünnungsreihe

des Chemotherapeutikums angelegt und jeder Verdünnungsstufe die gleiche Einsaatmenge einer standardisierten Bakterienkultur beigegeben. Nach einer Inkubation von mehreren Stunden -die Inkubation schwankt je nach Indikatorstamm- kontrolliert man, welche Antibiotika-Konzentration das Bakterienwachstum noch zu verhindern vermag. Es kann Schwierigkeiten bereiten, den Endpunkt festzulegen und eine Konzentration zwischen 2 Titerstufen ist nicht erfaßbar, was zu recht ungenauen Aussagen über den eigentlichen Antibiotika-Spiegel führen kann. Auch ist dieser Test aufwendig, sobald gleichzeitig eine größere Zahl von Therapeutika in die Prüfung einbezogen werden soll. Wie jeder mikrobiologische Test sind auch die Reihenverdünnungsmethoden unspezifisch, d.h. sie erfassen nur die allgemeine antimikrobielle Aktivität der Probe. Ich habe zur Bestimmung der Aminoglykosid-Antibiotika den Mikrotitertest angewandt, der auf dem Prinzip der Reihenverdünnungsmethoden beruht. Die genaue Beschreibung der Mikrotiter-Methode und die Beurteilung ihrer klinischen Verwendbarkeit ist in späteren Abschnitten behandelt.

(3) Urease-Methode

Die Urease-Methode wurde von Noone und Mitarbeitern entwickelt (14, 18-20). Es liegt diesem Test folgendes Prinzip zugrunde: Die induzierbare Urease des Bakterienstammes *Proteus mirabilis* spaltet hydrolytisch Harnstoff in CO_2 und 2NH_3 (vgl. Reaktionsgleichung S.50 im Anhang). Entsprechend der NH_4 -Produktion kommt es zu einem pH-Anstieg. Gentamicin, aber auch Tetrazykline, Chloramphenicol und Spectinomycin hemmen konzentrationsabhängig die Proteinsynthese und damit die Enzymproduktion, was zu einer geringeren pH-Verschiebung führt. Man stellt 2 Verdünnungsreihen X und X/2 auf, nach 70 Minuten Inkubation im Wasserbad von 37°C werden in beiden Verdünnungsreihen die pH-Bestimmungen durchgeführt, wobei sich eine Standardkurve entsprechend der Abb. 1b S.50 (vgl. 18-21) im Anhang ergibt.

Die vertikalen Differenzen für jedes Intervall von 0,1 pH-Einheiten ergeben einen Mittelwert, der der halben Gentamicin-Konzentration des Patientenserums entspricht. Der Vorteil dieser Methode besteht darin (14), daß 3 Stunden nach Blutabnahme das Ergebnis vorliegt. Allerdings wird eine Serummenge von 1,5 ml benötigt, eine Menge, die -besonders wenn von einem Neugeborenen häufiger Blut zur Kontrolle der Serumspiegel abgenommen werden muß- relativ groß ist. Ein weiterer Nachteil der Urease-Methode soll ihre geringe Empfindlichkeit bei Serumkonzentrationen unter 1,5 ug/ml sein (14, 18-20). Für ein anderes Medikament wie z.B. das Penicillin wäre dies adäquat, doch ein Test für Gentamicin sollte wegen der geringen therapeutischen Breite der Aminoglykosid-Antibiotika zuverlässig zwischen Konzentrationen von 8-12 ug/ml für die Spitzenwerte und 1,5-2,5 ug/ml für die Niedrigst-Spiegel unterscheiden können. Wenn die Voraussetzungen für reproduzierbare Meßresultate gegeben sind, nämlich ein Präzisions-pH-Meter und eine entsprechende Elektrode (13), so wird die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit dieser Technik wesentlich verbessert. Im allgemeinen aber wird dieses Verfahren nur selten zur Bestimmung von Aminoglykosiden im Serum herangezogen.

Da mikrobiologische Methoden eine relativ große Serummenge erfordern, in der Regel über Nacht inkubiert werden muß, das Ergebnis also erst am nächsten Tag vorliegt und diese Tests nur die allgemeine antimikrobielle Aktivität der Serumprobe erfassen, also unspezifisch sind, hat man sich bemüht, schnellere und für Aminoglykoside spezifische Methoden zu entwickeln, wobei die acetylierende radioenzymatische Methode und der Radio-Immun Assay im Mittelpunkt des Interesse stehen.

(II) NICHT-MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

(1) Radio-Immun Assay

Radio-Immun Tests wurden ursprünglich für Hormonbestimmungen entwickelt, jedoch gibt es seit einiger Zeit RIA-Kits zur

Messung von Gentamicin, Tobramycin und Amikacin im Serum. Diese Methode beruht auf der kompetitiven Verdrängung ^{125}J - oder H^3 -markierter Aminoglykosidmoleküle durch nicht-markierte von ihrem spezifischen Antikörper, wobei sich vereinfacht das Reaktionsschema von Abb. 2a S.51 im Anhang aufstellen läßt. Die Radioaktivität des $^{125}\text{J}/^3\text{H}$ -markierten Aminoglykosid-Antikörper-Komplexes nimmt im gleichen Maße ab wie die Konzentration der nachzuweisenden unmarkierten Substanz zunimmt und es ergeben sich die Standardkurven entsprechend der Abb. 2b (vgl.14) bzw. 2c S.51/52 im Anhang. Die Antikörper kann man durch Immunisieren von Kaninchen mit einem Aminoglykosid-Protein-Konjugat gewinnen, wobei das Aminoglykosidmolekül als Hapten fungiert. Die Trennung von Antikörper gebundenem, radioaktiv markiertem und freiem, radioaktiv markiertem Antibiotikum ist mit Anti-Kanin-Anti-Gamma-Globulin möglich und nach Zentrifugation und anschließendem Dekantieren des Überstandes läßt sich die Radioaktivität mit Hilfe eines Gamma-Counters bestimmen. Was den RIA vor allen hier aufgeführten Verfahren zur Bestimmung von Aminoglykosiden auszeichnet, ist seine hohe Spezifität. So zeigt sich in der Regel keine Kreuzreaktivität mit anderen Aminoglykosiden oder Antibiotika wie z.B. Cephalotin, Carbenicillin, Oxazillin, Cefazolin und Chloramphenicol. Nur zwischen Kanamycin und Amikacin -ein halbsynthetisches Derivat von Kanamycin- besteht eine Kreuzreaktivität von etwa 70% (29), doch wird man zwei Aminoglykoside nicht miteinander kombinieren. Um genaueres über diese Technik zu erfahren, möchte ich auf die Literatur (3, 5, 11, 12, 15, 29-32, 36) verweisen. Auch in unserem Labor wurden vorübergehend Radio-Immun Bestimmungen vorgenommen (vgl. hierzu die Standardkurve Abb. 2c im Anhang) und es hat sich eine gute Übereinstimmung mit der routinemäßig angewandten Mikrotiter-Methode ergeben. Stevens und Mitarbeiter haben bei einem Vergleich des RIA mit einem mikrobiologischen Test bzw. der acetylierenden radioenzymatischen Methode einen Korrelationskoeff-

fizienten von $r=0,89$ bzw. $r=0,91$ ermittelt (29-32). Da die Kosten für die RIA-Kits sehr hoch sind, die acetylierende radioenzymatische Methode vielseitiger ist -die Bestimmungen Bestimmungen beschräncken sich im Gegensatz zum RIA nicht nur auf Gentamicin, Tobramycin und Amikacin, sondern es läßt sich die Konzentration jedes Aminoglykosids ermitteln- und auch ebenso schnell und zuverlässig wie die Radio-Immun Methode ist, haben wir der acetylierenden radioenzymatischen Methode den Vorzug gegeben.

(2) Enzymatische Methoden

Zu den enzymatischen Tests zählen Phosphorylierung, Adenylylierung und Acetylierung. Benveniste & Davies (1) waren die Ersten, die die klinische Bedeutung Aminoglykosid-inaktivierender Enzyme erkannten. Wie geht nun die Modifikation der Aminoglykosid Moleküle vor sich? Nach Susumu Mitsuhashi (38) katalysieren die Enzyme die folgenden Reaktionen:

- (a) Die Phosphotransferasen katalysieren die Phosphorylierung der Hydroxylgruppe 3 am Ring I und III, der OH-Gruppe 5 am Ring III und der Hydroxylgruppe 6 von Ring II.

ENZYM

Am.glyk.-OH - ATP - - - - - Am.glyk.-Phosphat - ADP

- (b) Die Adenylyltransferasen adenylylieren die Hydroxylgruppe in Position 2 bzw. 3 von Ring III, die 6-OH Gruppe von Ring II.

ENZYM

Am.glyk.-OH - ATP - - - - - Am.glyk.-Adenylylat - $2PP_i$

- (c) Die Acetyltransferasen bewirken die Verknüpfung der Essigsäure mit den freien Aminogruppen in Position 2 und 6 von Ring I so wie in Position 3 von Ring II.

ENZYM

Am.glyk.-NH₂ - AcetylCoA - - - - - Am.glyk.-Acetat - CoA

Die verschiedenen inaktivierenden Enzyme sind in Tabelle IV S.53 im Anhang zu entnehmen. Diese Tabelle wurde aus dem Buch von Susumu Mitsuhashi (38) entnommen und sie soll zeigen, daß verschiedene Enzyme an demselben Molekül angreifen können bzw. ein Enzym mehrere Aminoglykoside modifizieren kann. Weiterhin ist zu entnehmen, daß Amikacin allein durch die 6'-N-Acetyltransferase inaktiviert und der Serumspiegel bestimmt werden kann. Von diesen 3 enzymatischen Abbaumöglichkeiten wird am häufigsten die Acetylierung als klinischer Test zur Bestimmung der Aminoglykosid-Spiegel herangezogen. Welche Hintergründe kann dies haben?

Bei der Phosphorylierung ist markiertes Jod von hoher Aktivität erforderlich, doch da damit ein zu hohes Risiko für das klinische Labor gegeben ist, hat sich diese Methode nicht durchsetzen können.(3,4).

Auch die Adenylylierung -das erste enzymatische Verfahren wurde in Form der Adenylylierung von Smith, van Otto, Smith (28) durchgeführt- ist der Acetylierung weit unterlegen. Bei der Adenylylierung muß man eine mögliche ATP-ase Aktivität im Serum berücksichtigen, d.h. das Serum ist vor der Aminoglykosid-Bestimmung frei von ATP-ase Aktivität zu machen. Auch lassen sich keine Amikacin- und wahrscheinlich auch keine Kanamycin-Spiegel ermitteln (29-32), was für eine Klinik wie die unsere, in der Amikacin bei Neugeborenen häufig appliziert werden muß, ein wichtiger Grund ist, der acetylierenden radioenzymatischen Methode den Vorzug zu geben. Broughall & Reeves (3), Stevens & Young (31) u.a. haben auf die hohen Background-Counts als weiteres Problem der Adenylylierung aufmerksam gemacht, was zur Folge hat, daß bei Gentamicin-Konzentrationen unter 2,5 µg/ml der Zählirrtum größer wird. Auch muß bei der Adenylyltransferase Methode, um die relative Standardabweichung des Zählirrtums auf 1% zu vermindern (bei 10.000 Counts beträgt der Zählirrtum 1%), jede Probe 10 Minuten gezählt werden,

bei der acetylierenden radioenzymatischen Methode aber nur 1 Minute (3).

Die acetylierende radioenzymatische Methode wird seit einiger Zeit in der Universitätskinderklinik München zur Kontrolle der Aminoglykosid-Spiegel herangezogen. In unserem Labor steht die 6'-N-Acetyltransferase zur Verfügung, die wir von dem R⁺ E.coli Stamm R5/W677 erhalten. Der Stamm kommt aus dem Labor von Dr. Julien Davies, University of Wisconsin, USA. Ein großer Vorteil der 6'-N-Acetyltransferase ist ihr breites Substratspektrum und so konnte ich Amikacin-, Tobramycin-, Sisomicin und im Rahmen einer Qualitätskontrolle auch Gentamicin-Bestimmungen durchführen. Das Prinzip der acetylierenden radioenzymatischen Methode findet sich in Abb. 3 S.54 im Anhang. und die genaue Beschreibung dieser von mir angewandten Methode findet sich im folgenden Abschnitt.

(3) Immun-Fluoreszenz Test

Dieser Test findet sich noch in der Entwicklung und so möchte ich nicht näher darauf eingehen.

Nachdem ich einen Überblick über die zur Ermittlung der Aminoglykosid-Konzentrationen geeigneten und in der Klinik üblichen Verfahren gegeben habe, möchte ich im Detail auf die von mir während meiner Vergleichsstudie angewandten Methoden -Mikrotitertest und acetylierende radioenzymatische Methode- eingehen. Bei meinen Versuchen ging es darum, festzustellen, in wie weit eine Korrelation zwischen beiden Testverfahren besteht, wie zuverlässig und reproduzierbar die Resultate dieser Methoden sind und es sollten beide Tests in Bezug auf ihre klinische Verwendbarkeit beurteilt werden.

(C) Material und Methoden

(I)(1a) Material für die acetylierende radioenzymatische Methode
markiertes und unmarkiertes AcetylCoA: ¹⁴C-AcetylCoA kann

als Lösung (New England Nuclear Corp) oder als Pulver (Amersham Radiochemicals Ltd) gekauft werden und enthält eine spezifische Aktivität von ca. 60 mCi/mMol. Molekulargewicht von AcetylCoA 900, daher entsprechen 50 uCi 0,75 mg. Für unsere Bestimmungen eignet sich eine Aktivität, die man nach 1:1,33 Verdünnung (gewichtsmäßig) mit unmarkiertem AcetylCoA erreicht. Man benötigt hierfür ca. 1 mg unmarkiertes AcetylCoA. Das Gesamtgewicht beträgt somit 1,75 mg. Wenn diese Menge in 13 ml Aqua dest gelöst wird, ergibt sich eine Endkonzentration von 1,5 nMol ^{14}C -AcetylCoA in 10 ul. Für die experimentellen Bedingungen sind 1,5 nMol markiertes AcetylCoA erforderlich, um eine Standardkurve im therapeutischen Bereich zu erhalten. Anschließend wird das Isotop in 0,1 ml Portionen aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt. Später haben wir gefunden, daß durch lyophilisieren eine längere Haltbarkeit des Substrats erreicht wird (AcetylCoA ist instabil) und seither lyophilisieren wir die 0,1 ml Portionen aus markiertem und unmarkiertem Substrat, so daß das Isotop lange bei -20°C haltbar ist, ohne an Aktivität einzubüßen.

Liquid Szintillation Counter (B-Zähler)

Szintillationsflüssigkeit: Liquid Szintillator KL 402

E.Max. 415 nm

Phosphozellulose Papier (Firma Whatman, England)

variable Mikropipetten 5-50 ul, 50-250 ul, 200-1000 ul

Mikrotips

schüttelndes Wasserbad

Sonikator (Dawe Typ 3057 A Soniprobe) für die Enzymherstellung mit dem Ultraschall-Verfahren

Zentrifuge für die Enzymherstellung mit dem osmotischen Schock (7000 bzw. 20.000 Umdrehungen)

E.coli R5/W677 erhalten auf Nutrient Agar plus Tobramycin 10 mg/l

Plastikwegwerfröhrchen
Szintillationsbehälter
Citratpuffer pH 5,7:

120 mM Na-Citrat
12 mM $MgCl_2$
4 mM Dithiothreitol

nach Zusammensetzung in 0,5 ml Portionen aufteilen und bei $-20^{\circ}C$ aufbewahren

0,01 M Tris plus 0,03 M NaCl, pH 7,8

20% Saccharose plus 3×10^{-3} M EDTA plus 0,033 M Tris, pH 7,8

PBS-Puffer pH 7,2-7,4

NaCl ₂	pH 8,00
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,15
KCl	0,20
KH ₂ PO ₄	0,20
Aqua bidest ad 1000 ml	

(I)(1b) Enzymherstellung

Ultraschall-Verfahren (Sonication)

1. E.coli R5/W677 in 3,0 l Nährbouillon einimpfen. 16 Stunden über Nacht in einem schüttelnden Wasserbad bei $37^{\circ}C$ wachsen lassen.
2. Am folgenden Tag 5 Minuten bei 14.000 g zentrifugieren.
3. Sediment 2x in einer Mischung von 30 mM NaCl plus 10 mM Tris-Cl-Pufferlösung pH 7,8 waschen.
4. Nach einer zweiten Wäsche Sediment in 0,5 mM $MgCl_2$ bei $4^{\circ}C$ suspendieren. Hierfür sind 5 ml 0,5 mM $MgCl_2$ für je 100 ml Stammkultur nötig.
5. Ultraschall-Behandlung 20 Sekunden in einem geeigneten Gerät bei einem Strom von 4 Amper und unter strenger Temperaturkontrolle.
6. 20 Minuten bei 25.000 g zentrifugieren.
7. Der Überstand enthält das Enzym und kann in 0,1 ml Portionen bei $-20^{\circ}C$ gelagert werden. Sediment verwerfen.

Osmotischer Schock

1. E.coli auf frische Tobramycinplatte überimpfen
2. Am folgenden Tag einige Kolonien in 3 ml Nährbouillon überimpfen und bis abends wachsen lassen. Den Inhalt auf 2x21 Nährbouillonflaschen verteilen und über Nacht in einem schüttelnden Wasserbad bei 37°C wachsen lassen. Nach 8-10 Stunden ist das Ende der exponentiellen Wachstumsphase erreicht, d.h. unter geeigneten Bedingungen findet sich ein Titer von mehr als 10^9 Keimen/ml.
3. Bouillon bei 7000 Umdrehungen zentrifugieren und das Pellet sammeln.
4. 2x bei Raumtemperatur mit einer Mischung von 0,01 M Tris plus 0,03 M NaCl, pH 7,8 den Stamm waschen und anschließend 20 Minuten bei 20.000 g zentrifugieren. Vor dem Zentrifugieren das Pellet immer gut aufschütteln.
5. Pellet in 0,033 M Tris plus 3×10^{-3} M EDTA plus 20% Saccharose pH 7,8 suspendieren und 20 Minuten stehen lassen, damit die Zellen besser aufquellen können. Anschließend je 2x20 Minuten zentrifugieren, wobei nach jedem Zentrifugieren der Überstand zu verwerfen ist und von Neuem Puffer dazu zu geben ist.
6. Pellet in 40 ml kaltem 0,5 mM $MgCl_2$ suspendieren, ca. 15 Minuten mit Magnetrührer bei 4°C stehen lassen. $MgCl_2$ bewirkt die Zerstörung der Bakterienzellen und damit die Freisetzung ihres Inhalts, also auch des Enzyms.
7. Anschließend 20 Minuten bei 20.000 g zentrifugieren. Der Überstand enthält das Enzym und kann in 0,1 ml Portionen bei -20°C gelagert werden. Sediment verwerfen. Da das Enzym wärmelabil ist, sollte es vor Gebrauch nicht über 6°C erwärmt werden.

(I)(2) Material für den Mikrotiter-Test

Sterile Glasröhrchen für die Herstellung der Standards
Mikrotiterplatten

variable Mikropipette 0-50 ul, sterile Pipettenspitzen

Standard-I-Nährbouillon: 2,5 g in 100 ml Aqua bidest

roter Bouillon: 2,5 g

SNB I

2,5%

Glucose

0,004 g

Phenolrot

in 100 ml Aqua dest.

sterile Pasteurpipetten (1 Tropfen sind 25 μ l)sterile Tropfpipette (1 Tropfen entsprechen 25 μ l)

Photometer

Küvettröhrchen um die Absorption der Bakterien zu messen

Alufolie

Brutschrank mit Humidifikation

(II) Methoden

(1) Acetylierende radioenzymatische Methode

Wie bereits erwähnt habe ich Amikacin-, Tobramycin-, Sisomicin- und Gentamicin-Spiegelbestimmungen mit Hilfe der acetylierenden radioenzymatischen Methode durchgeführt. Das Aminoglykosid-inaktivierende Enzym, die 6'-N-Acetyltransferase erhielten wir vom R⁺ E.coli Stamm R5/W677. Der Coli-Stamm der ursprünglichen Kultur wurde auf einen Agar mit Tobramycin 10 mg/l überimpft, um einem Verlust des äußerst labilen R-faktors zu vermeiden und um das selektive Wachstum von Organismen, die die 6'-N-Acetyltransferase produzieren können, zu gewährleisten. Das Enzym selbst haben wir in der Regel mit dem osmotischen Schock hergestellt und wenn es gelungen ist, ein gutes Enzym herzustellen -das bedeutet adäquate Counts und eine Standardkurve im therapeutischen Bereich-, so ist es im Tiefkühlschrank bei Temperaturen um -20°C für 2-3 Monate haltbar. Nach der Enzymherstellung haben wir jedes mal von Neuem durch Titration geprüft, in welchem Verhältnis ¹⁴C-AcetylCoA, Enzym und Serum gegeben werden müssen. In der Regel habe ich 20 ul Serum vorgegeben, 15 ul Substrat plus 35 ul Enzym pro Röhrchen dazu pipettiert, bis auf Amikacin, das die höchsten Counts bei

- einem Verhältnis von 15 μ l ^{14}C -AcetylCoA plus 40 μ l Enzym und 15 μ l Serumvorgabe ergab. Der erste Schritt besteht also darin
1. 15 μ l bzw. 20 μ l Standardlösung oder Patientenserum vorzupipettieren.
 2. Substrat vorbereiten: 250 μ l Citratpuffer mit 0,1 ml ^{14}C -AcetylCoA mischen.
Substratvolumen: ^{14}C : 15 μ l x (Anzahl d. Röhrchen + 2) bzw. 20 μ l
Enzymvolumen: E: 35 μ l x (Anzahl d. Röhrchen + 2) bzw. 40 μ l
 3. Substrat mit Enzym mischen und 50 bzw. 55 μ l pro Röhrchen pipettieren.
 4. Bei 37°C für 30 Minuten im Wasserbad inkubieren.
 5. Inzwischen P-81-Papier nach Muster ausschneiden.
 6. Nach der Inkubation 60 bzw. 65 μ l Inkubationsmischung auf jedes Blatt P-81-Papier geben. Da das Phosphozellulose Papier negativ geladen ist und der ^{14}C -Acetyl-Aminoglykosid-Komplex positiv, wird der radioaktiv markierte Komplex fest an das Papier gebunden und
 7. Die überschüssige freie Radioaktivität läßt sich mit Hilfe eines PBS-Puffers wegwaschen: 2 x 4 Minuten waschen.
 8. Papiere entfernen und 3-4 Minuten im Ofen bei 130°C antrocknen lassen.
 9. Papiervierecke abschneiden. Jedes in einen Szintillationsbehälter geben und 10 ml einer Szintillationsflüssigkeit dazugeben. In einem β -Zähler wird jedes Röhrchen für 1 Minute gezählt.
 10. Standardkurve aufstellen. Testwerte ablesen.
Das Prinzip der acetylierenden radioenzymatischen Methode ist in Abb. 3 S.54 im Anhang dargestellt.

(2) Mikrotiter-Test

Der Mikrotiter-Test ist ein in der Durchführung einfacher Plattenverdünnungstest, bei dem die einzelnen Stufen 1:2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	16	12										
B	8	6										
C	4	3										
D	15 ₁											
E	15 ₂											
F	15 ₃											
G	15 ₄											
H												

Abb. 4

verdünnt sind. In die Löcher 3-12 jeder Reihe (vergleiche hierzu obere Abbildung) werden je 25 ul Standard-I-Nährbouillon getropft. In Loch 1 und 2 von Reihe A-C werden je 50 ul der Standardlösung nach Muster pipettiert. Die folgenden Reihen dienen zur Bestimmung der Serumproben, wobei in Loch 1 50 ul Patientenserum und in Loch 2 31 ul Patientenserum plus 19 ul Bouillon pipettiert werden. Anschließend wird jede Reihe mit 25 ul titriert, d.h. 25 ul von Loch 1 nach 3, von 3 nach 5 ... bzw. von 2 nach 4, von 4 nach 6 ... 25 ul pipettieren. Mit einem Küvettröhrchen, das 3 ml Bouillon enthält, wird bei einem Photometer der Nullpunkt bei einer Dichte von 650 nm eingestellt und anschließend werden solange Bakterien dazu gegeben, bis das Photometer eine Absorption von 0,05 anzeigt. Ich habe hierfür häufig einen Pseudomonas-Stamm verwendet, den ich in der Regel für 5-8 Stunden in Standard-I-Nährbouillon in einem Wasserbad von 37°C wachsen ließ. Anschließend werden die Bakterien 1:100 in Standard-I-Nährbouillon und dann 1:10 in rotem

Bouillon verdünnt. Mit einer sterilen Pasteurpipette wird die Platte mit den 1:1000 verdünnten Bakterien getropft, wobei 1 Tropfen 25 μ l entsprechen. Als nächstes wird die Platte in eine feuchte Kammer gebracht und über Nacht in einem Brutschrank mit Humidifikation bebrütet. Nach 14-16 Stunden Inkubation läßt sich die minimale Hemmkonzentration berechnen. Als minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet man die niedrigste Konzentration, die für das bloße Auge noch kein Wachstum der Bakterien erkennen läßt. In unserem Beispiel beträgt die MHK 0,50 μ g/ml. Zur Ermittlung der MHK sollte eine Übereinstimmung in mindestens 2 Standardreihen vorliegen. Die zu errechnenden Konzentrationen sind in unserem Beispiel für Patientenserum 1 0,75 μ g/ml, für Patientenserum 2 3 μ g/ml und für Patientenserum 3 12 μ g/ml, wobei man immer vom letzten Loch ohne Wachstum rückrechnen muß. Es kann einmal vorkommen, daß überhaupt nichts wächst, was zwei Gründe hat: Entweder der Teststamm ist gegenüber dem zu bestimmenden Aminoglykosid zu empfindlich oder das Patientenserum muß über zwei Reihen titriert werden, da es eine sehr hohe Konzentration des Antibiotikums enthält (dies trifft in unserem Beispiel für Patientenserum 4 zu). Um zu zeigen, daß bei der Herstellung der Standards unter sterilen Bedingungen gearbeitet wurde, kann man zur Kontrolle in ein Loch 25 μ l des 16-er Standards pipettieren, ohne Bakterien dazu zu tropfen. Findet sich neben dem zu bestimmenden Aminoglykosid noch ein anderes Antibiotikum im Serum, so muß man einen Stamm wählen, der empfindlich gegenüber dem Aminoglykosid und resistent gegenüber dem zweiten Chemotherapeutikum ist. Um dies zu kontrollieren, sollte man eine Reihe mit dem zusätzlich gegebenen Medikament titrieren und es wird sich in allen Löchern Wachstum finden. In diesem Zusammenhang möchte ich noch an die Beurteilung der Empfindlichkeit eines Keimes erinnern, welche sich nach in vitro Parametern richtet und wobei als Faustregel gilt: Die Serumkonzentration sollte die minimale

Hemmkonzentration überschreiten.

Die Standards für den Mikrotiter-Test und die acetylierende radioenzymatische Methode habe ich in gepooltem Humanserum hergestellt: Die Ausgangslösung von 1000 ug/ml wurde 1:10 mit menschlichem Serum verdünnt und von diesen 100 ug/ml die Standards 16, 12, 8, 6, 4, 3, 2, 1 ug/ml hergestellt, wobei bei der Reihenverdünnungsmethode im Gegensatz zur acetylierenden radioenzymatischen Methode auf steriles Arbeiten zu achten ist.

(III) Beurteilung der Methoden

(a) Quantitative Auswertung

(1) Als erstes habe ich einen Vergleich beider Methoden angestellt, indem ich von 48 Patientensera je einmal die Aminoglykosid-Konzentration mit beiden Tests ermittelt habe. Es sollte sich zeigen, in wie weit eine Korrelation zwischen acetylierender radioenzymatischer Methode und Mikrotiter-Test vorliegt. Dem Vergleich der Serumproben wurde die lineare Regressionsgleichung $y=a - bx$ zugrunde gelegt, wobei a dem y-Abschnitt für $x=0$ entspricht und b die Steigung der Regressionsgeraden ist.

(2) Zur Überprüfung der Genauigkeit habe ich anschließend eine Qualitätskontrolle mit Gentamicin und ein "Spiking Recovery" mit Sisomicin durchgeführt. Die 4 Gentamicinproben, deren Aminoglykosid-Konzentration uns unbekannt war, erhielten wir von einem Referenzlabor aus England, das im Rahmen von Qualitätskontrollen unbekannte Serumproben mit einem oder auch mehreren Antibiotika von Laboratorien im ganzen Land bestimmen läßt, um die Genauigkeit der lokalen Bestimmungsmethoden zu überprüfen. Auch ein "Spiking Recovery" erlaubt eine Aussage über die Präzision eines Testverfahrens. Bei einem "Spiking Recovery" gibt man zu einer bekannten Konzentration verschiedene Standards im Verhältnis 1:1 und berechnet anschließend um wieviel Prozent der gemessene vom erwarteten Wert abweicht.

(3) Als nächstes habe ich Mehrfachbestimmungen von ein- und

demselben Serum vorgenommen, um die Genauigkeit und besonders die Reproduzierbarkeit beider Tests zu bewerten. Der Auswertung liegt die Statistik von Reeves & Bywater (24) zugrunde, die folgende Richtlinien für die Genauigkeit einer Methode setzt:

Methode "gut"	$(x \pm 2xS.D.)\%$ <25% bei 95%-igen Vertrauensgrenzen
"schlecht"	26-50%
"stark irreführend"	>50%

wobei x: prozentuale Abweichung des Mittelwerts vom wahren Wert
S.D.: Standardabweichung in Prozent bezogen auf den wahren Wert

Im günstigsten Fall liegen also 19 von 20 Bestimmungen in einem Intervall von weniger als 25% um den wahren Wert.

Bei den 3 Sisomicinstandards ist die Serumkonzentration bekannt, aber bei den 3 Patientensera ist der wahre Serumspiegel unbekannt und so habe ich den Mittelwert der Mehrfachbestimmungen der Patientensera als wahre Konzentration meiner statistischen Auswertung zugrunde gelegt.

(b) Qualitative Auswertung

Diese erfolgt in Bezug auf die Spezifität, Schnelligkeit, Empfindlichkeit und Vielseitigkeit der jeweiligen Methode.

(D) Ergebnisse

Abb.5: Standardkurven für verschiedene Aminoglykoside.

Verwendetes Enzym: 6'-N-Acetyltransferase

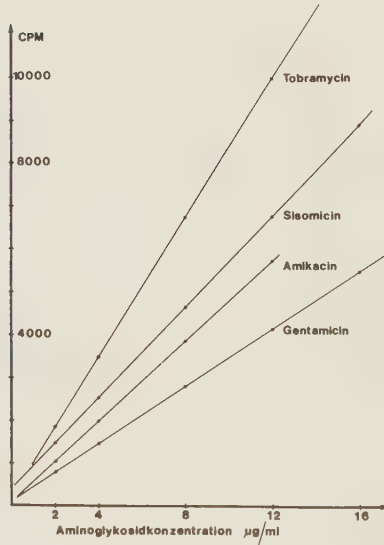


Tabelle V: Vergleich zwischen der acetylierenden radiozymatischen Methode (REM) und dem Mikrotiter-Test (M) unter Verwendung von 48 Testsera.
Bereich: 0,20-59,20 ug/ml Aminoglykosid.

AMIKACIN				SISOMICIN				TOBRAMYCIN				GENTAMICIN				INSGESAMT
REM	M	%Diff.		REM	M	%Diff.		REM	M	%Diff.		REM	M	%Diff.		
25,60	32,00	+ 25,00		4,40	4,00	- 9,09		0,20	0,37	+ 85,00		10,20	12,00	+17,65		44 (Ohne *)
11,20	12,00	+ 7,14		1,50	0,75	-50,00		7,20	8,00	+ 11,11		2,00	3,00	+50,00		
25,60	24,00	- 6,25		5,50	8,00	+45,45		1,30	1,00	- 23,08		3,40	4,00	+17,65		
6,40	6,00	- 6,25		1,10	0,75	-31,82		0,60	1,00	+ 66,67		1,40	1,50	+ 7,14		
24,20	16,00	- 33,88		8,50	8,00	- 5,88		5,10	6,00	+ 17,65						
10,00	8,00	- 20,00		9,50	12,00	+26,32		0,50	1,00	+100,00						
28,00	32,00	+ 14,29		12,90	12,00	- 6,98		0,50	1,00	+100,00						
3,30	3,00	- 9,09		6,60	6,00	- 9,09		9,20	12,00	+ 30,43						
4,90	6,00	+ 22,45		5,40	6,00	+11,11		8,40	6,00	- 28,57						
* 0,50	2,00	+300,00		5,80	6,00	+ 3,45		0,50	1,00	+100,00						
11,20	12,00	+ 7,14		3,10	6,00	+93,55		1,90	0,37	- 80,53						
* 0,50	2,00	+300,00						5,60	8,00	+ 42,86						
10,20	12,00	+ 17,65														
59,20	48,00	- 18,92														
34,40	48,00	+ 39,53														
4,70	4,00	- 14,89														
0,70	1,00	+ 42,86														
16,20	16,00	- 1,23														
9,60	12,00	+ 25,00														
* 2,00	16,00	+700,00														
* 5,50	16,00	+190,00														
N (Anzahl d. Proben):			17				11				12				4	23,25
(Ohne *)																
r (Korrel.koeff.):			0,935				0,921				0,937				0,954	
a :			0,566				0,597				0,110				0,854	
b :			0,989				0,979				1,083				0,957	
mittl. %Differenz:			18,29				26,55				57,25				31,42	
Regressionsgerade: y = a + bx																

Abb.6: Vergleich zwischen der acetylierenden radioenzymatischen Methode und dem Mikrotiter-Test unter Verwendung von 44 Testsera. Bereich: 0,20-59,20 ug/ml Aminoglykosid
 $r=0,954$
 $y=0,957x + 0,854$

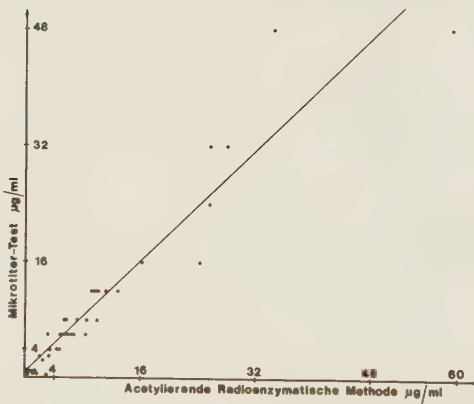


Tabelle VI

Ergebnisse der Qualitätskontrolle unter Verwendung von

4 Testsera. Bereich: 2,10-11,70 ug/ml Gentamicin.

R E M			MIKROTITER-TEST	
Sollwert	Istwert	%Abweichung	Istwert	%Abweichung
ug/ml	ug/ml	v. Sollwert	ug/ml	v. Sollwert
11,70	10,20	- 13	12,00	+ 3
1,70	2,00	+ 18	3,00	+ 16
3,50	3,40	- 3	4,00	+ 14
2,10	1,40	- 33	1,50	- 29

REM: acetylierende radioenzymatische Methode

Tabelle VII

Spiking Recovery: Sisomicinbestimmung 2-er Testsera mit der

acetylierenden radioenzymatischen Methode

(REM) bzw. dem Mikrotiter-Test

R E M			MIKROTITER-TEST	
	9,10 ug/ml	7,30 ug/ml	10,00 ug/ml	8,00 ug/ml
ug/ml	% gemessene Konzentration/erwartete Konzentration			
+ 0	106,50	89,70	120,00	100,00
+ 1	102,00	99,20	109,10	133,30
+ 2	105,40	96,10	100,00	120,00
+ 3	104,90	98,40	123,10	109,10
+ 4	101,50	98,60	114,30	133,30
+ 6	101,30	104,80	150,00	114,30
+ 8	96,50	96,30	133,30	150,00
MW	102,59	97,59	121,40	122,86
S.D.	± 3,39	± 4,52	± 16,45	± 17,07

MW: Mittelwert

S.D.: Standardabweichung

N: Anzahl der Bestimmungen, $\bar{x}$: Mittelwert, s: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient

	Standard 1		Standard 2		Standard 3		Pat.serum 1		Pat.serum 2		Pat.serum	
	REM	M	REM	M	REM	M	REM	M	REM	M	REM	M
N:	2,00		4,00		8,00		1,05	0,90	4,57	4,80	12,16	11,47
x:	2,25	2,00	4,80	4,00	7,80	8,00	0,85	1,00	4,50	6,00	12,20	12,00
s:	1,90	2,00	3,80	4,00	8,00	8,00	1,20	1,00	4,40	6,00	12,40	12,00
VK:	2,00	2,00	3,80	4,00	7,90	8,00	1,00	0,50	4,20	4,00	12,40	12,00
	1,90	2,00	3,70	2,00	8,10	12,00	1,00	1,00	4,50	4,00	11,80	12,00
	1,95	2,00	3,85	4,00	7,90	8,00	1,20	0,75	4,80	6,00	11,60	12,00
	1,50	1,00	4,40	4,00	8,10	8,00	0,80	0,75	4,40	4,00	11,60	12,00
	2,00		4,60		7,70				4,80		12,40	
	2,00	2,00	4,00	4,00	8,30	12,00	0,80	0,75	4,50	6,00	12,80	16,00
	2,00	2,00	4,30	4,00	7,90	8,00	0,85	1,00	4,40	4,00	11,60	8,00
	2,30	2,00	4,00	4,00	8,40	12,00	1,40	1,00	4,70	4,00	12,40	12,00
	2,20	2,00	4,50	4,00	8,10	8,00	1,20	1,00	4,80	6,00	12,80	16,00
	2,30		4,50				1,20		5,00		12,00	
	2,15	2,00	3,85	4,00	8,40	12,00	1,20	1,00	4,60	4,00	12,20	12,00
	2,15	2,00	4,25	2,00	8,10	8,00	1,20	1,00	4,90	8,00	12,40	16,00
	2,00		3,50		8,20		1,00		4,00		12,60	
	2,10	2,00	4,20	4,00	8,00	8,00	1,20	1,00	4,40	4,00	11,60	8,00
	2,50	1,00	3,65	3,00	7,60	8,00	0,70	0,75	4,80	4,00	6,00	6,00
	2,10	1,00	2,00		7,40	6,00	1,00	1,00			4,00	6,00
N:	18	15	17	15	17	15	17	16	17	15	15	15
x:	2,07	1,80	4,10	3,53	7,99	8,93	1,05	0,90	4,57	4,80	12,16	11,47
s:	0,21	0,41	0,38	0,83	0,27	1,98	0,20	0,16	0,26	1,26	0,44	3,25
VK:	10,31	23,00	9,19	23,60	3,38	22,17	18,76	17,57	5,78	26,35	3,58	28,33
N:	Anzahl der Bestimmungen,	x:	Mittelwert,	s:	Standardabweichung,	VK:	Variationskoeffizient					

Tabelle VIII b: Reproduzierbarkeit verschiedener Methoden bei der Bestimmung von Aminoglykosiden

Shannon, Phillips ²⁷										Broughall, Reeves ⁴										eigene Ergebnisse													
2'-N-Acetyltransferase										6'-N-Acetyltrans.										6'-N-Acetyltransferase													
Gentamicinstandards										Gentamicinstand.										Siso. standards + Patientensera													
1,56	3,12	6,25	12,50	2,50	5,00	10,00	2,00	4,00	8,00	1,05	4,57	12,16	2,00	4,00	8,00	0,90	4,80	11,47															
ug/ml																				ug/ml		ug/ml		ug/ml		ug/ml		ug/ml		ug/ml			
N: 10	10	10	10	15	15	14	18	17	17	17	17	17	15	15	15	15	16	15	15														
x: 1,79	3,24	6,72	13,25	2,58	4,94	10,09	2,07	4,10	7,99	1,05	4,57	12,16	1,80	3,53	8,93	0,90	4,80	11,47															
s: 0,17	0,16	0,13	0,25	0,13	0,24	0,47	0,21	0,38	0,27	0,20	0,26	0,44	0,41	0,83	1,98	0,16	1,26	3,25															
x%: 14,74	3,85	7,52	6,00	2,69	1,29	0,64	3,61	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	10,00	11,67	11,67	0,00	0,00	0,00															
s%: 10,58	4,97	2,08	1,96	5,49	4,90	4,63	10,68	9,42	3,38	18,71	5,78	3,58	20,70	20,85	24,75	17,57	26,35	28,33															
(x+2s)%: 35,89	13,78	11,68	9,92	13,67	11,09	9,90	24,98	21,33	6,76	37,42	11,55	7,16	51,40	53,36	61,19	35,14	52,70	56,66															

Statistik nach Reeves, Bywater (25)

- N: Anzahl der Bestimmungen
 x: Mittelwert
 s: Standardabweichung
 x%: Prozentuale Abweichung des Mittelwerts vom wahren Wert
 s%: Standardabweichung in Prozent bezogen auf den wahren Wert

Abb. 17: Enzymkinetik: Nach welcher Inkubationszeit ergeben sich die höchsten Counts pro Minute?
Standard: 8 ug/ml Amikacin.

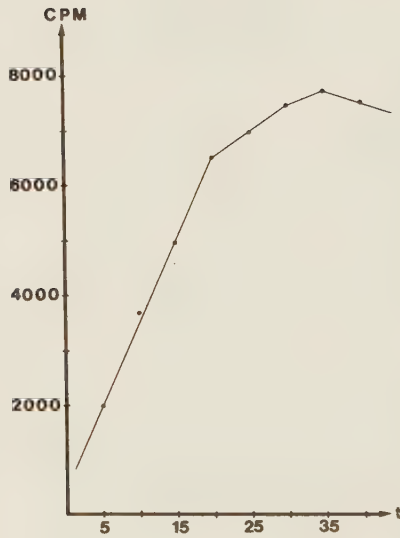


Tabelle IX

Zusammenfassung der quantitativen und qualitativen Auswertung des Vergleichs zwischen acetylierender radioenzymatischer Methode (REM) und dem Mikrotiter-Test.

	R E M	MIKROTITER-TEST
Korrelation:	r=0,954	
Empfindlichkeit:	auch im Bereich niederer Konzentrationen bei beiden Methoden ausreichend	
Spezifität:	gut, Störung durch Chloramphenicol bzw. durch Lipidlösungen	schlecht, da nur die allgemeine antimikrobielle Aktivität erfaßt wird
Genauigkeit bei 10 ug/ml:	$\pm 8\%$ (=2xS.D.)	$\pm 34\%$ (=2xS.D.)
Serummenge pro Bestimmung:	15-30 ul	81 ul
Arbeitsaufwand:	1 1/2-2 h	15-30 Minuten
Ergebnis nach:	2-3 Stunden	14-16 h Inkubation
Probleme:	Chloramphenicol	unbekannte zusätzliche Antibiotika
Kosten:	teuer	billig

(E) Diskussion

(I) Quantitative Beurteilung beider Methoden

(1) Standardkurven, Standardreihen

In der Regel fand ich bei den Sisomicin-, Tobramycin- und Gentamicin-Bestimmungen mit der 6'-N-Acetyltransferase (E.coli R5/W677) eine Linearität zwischen Counts pro Minute und Konzentration bis 12 oder 16 ug/ml. Bei Amikacin verlief die Standardkurve nur bis 8 ug/ml, selten bis 12 ug/ml, dann fiel die Gerade ab. Unter den Reaktionsbedingungen, unter denen ich während meiner Vergleichsstudie die acetylierende radioenzymatische Bestimmung der Aminoglykoside vorgenommen habe, ergeben sich hierfür zwei wahrscheinliche Interpretationsmöglichkeiten: (a) Das Enzym wird gesättigt oder aber (b) es ist zu wenig markiertes AcetylCoA pro Röhrchen vorhanden. Inzwischen haben wir festgestellt, daß bei den Bestimmungen während meiner Vergleichsstudie -diese wurde noch nicht unter optimalen Reaktionsbedingungen durchgeführt- das Letztere der Fall war. Seither lyophilisieren wir das Gemisch aus markiertem und unmarkiertem Substrat (1:1,33) und versetzen das Lyophilisat statt mit 250 ul Reaktionspuffer nur mit 100 ul Puffer, pH 5,7. Daraus ergibt sich in dem Gemisch aus Substrat und Reaktionspuffer eine Konzentration von $7,5 \times 10^{-2}$ nMol ^{14}C -AcetylCoA pro ul statt wie früher $4,3 \times 10^{-2}$ nMol pro ul. Nachdem wir nun also markiertes Substrat plus unmarkiertes Substrat lyophilisieren (dadurch ist das Substrat länger haltbar) und weniger verdünnt gebrauchen, ergibt sich sogar bei Amikacin eine Gerade bis 40 ug/ml. Wenn wir eine Standardkurve bis zu dieser Konzentration haben, muß natürlich ein Patientenserum, in dem wir einen hohen Aminoglykosid-Spiegel erwarten, wie z.B. im Serum eines niereninsuffizienten Patienten, weniger hoch bzw. nicht verdünnt werden im Vergleich zu einer Standard-

kurve, die eine maximale Linearität bis 12 oder 16 $\mu\text{g/ml}$ zeigt, so wie es bei den von mir durchgeführten Bestimmungen normalerweise der Fall war. Dadurch ist der Arbeitsaufwand geringer, wir sparen Zeit und Kosten. Die Abb. 5 S. 20 zeigt die Standardkurven verschiedener Aminoglykoside, die ich bei meinen Bestimmungen mit der 6'-N-Acetyltransferase gefunden habe. Durch Titration jeder Komponente lassen sich die Reaktionsbedingungen optimieren. Mit anderen Worten: Nach der Herstellung des Enzyms ist jedesmal von Neuem zu prüfen, in welchem Verhältnis ^{14}C -AcetylCoA, Enzym und Serum gegeben werden müssen, um adäquate Counts und eine Standardkurve im therapeutischen Bereich zu erhalten. Wie bereits erwähnt, waren während meiner Vergleichsstudie die Reaktionsbedingungen für die acetylierende radioenzymatische Methode noch nicht optimal, da bis zu diesem Zeitpunkt in der Universitätskinderklinik München Aminoglykosid-Bestimmungen mit der Mikrotiter-Methode durchgeführt wurden und die acetylierende radioenzymatische Methode als Schnellmethode zur Ermittlung der Aminoglykosid-Spiegel erst eingeführt werden sollte. Im Anhang findet sich eine Beschreibung der enzymatischen Methode, so wie sie zur Zeit in der Universitätskinderklinik München unter optimierten Reaktionsbedingungen bei der Kontrolle der Aminoglykosid-Serumspiegel angewandt wird.

Einige Autoren (7) haben bei Verwendung derselben Reagentien auf das tägliche Mitlaufen eines Standards verzichtet, da sie bei Konzentrationen zwischen 2 und $10\mu\text{g/ml}$ eine Streuung im üblichen Meßbereich fanden. Dies ist sicherlich von Vorteil, da man Isotop und Zeit spart -beide sind bekanntlich teuer. Dennoch halte ich es für sinnvoll, unabhängig davon, ob alte oder neue Reagentien zur Herstellung einer Standardkurve benutzt werden, bei jeder klinischen Spiegelbestimmung eine neue Standardkurve aufzustellen, um möglichst genaue und vergleichbare Resultate zu erhalten. Für die Aufstellung der Standard-

kurve genügen Einfachbestimmungen, da es bei 4 oder 5 Werten sofort auffällt, wenn ein Wert nicht auf der zu erwartenden Geraden liegt. Die Serumproben von Patienten sollten in jedem Fall zur Kontrolle doppelt bestimmt werden. Wenn die Werte einer Doppelbestimmung voneinander variieren, so kann die enzymatische Bestimmung vor Gabe der nächsten Dosis wiederholt werden, da Aminoglykoside bei intakter Nierenfunktion in der Regel alle 8-12 Stunden appliziert werden und ein Test mit 5 Standardröhrchen und je 2 Röhrchen vor bzw. nach Gabe innerhalb von 2 Stunden durchzuführen ist.

Zur Ermittlung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) habe ich unter sterilen Bedingungen 3 Standardverdünnungsreihen in gepooltem Humanserum hergestellt (vgl. Abb. 4 S. 16) und mit dem in Nährbouillon suspendierten Testkeim beimpft. Es genügt eine Übereinstimmung in 2 Reihen, um die MHK festlegen zu können, die je nach Teststamm und Antibiotikum variiert. Wenn die MHK's aller 3 Reihen voneinander abweichen, sollte der Test besser wiederholt werden.

(2) Korrelation

Zur Bestimmung der Aminoglykoside habe ich 2 Methoden herangezogen: den Mikrotiter-Test, einen Plattenverdünnungstest, bei dem die einzelnen Stufen 1:2 verdünnt sind und die acetylierende radioenzymatische Methode. Mit diesen beiden Testverfahren habe ich je einmal die Konzentration von 48 Patientensera ermittelt. Wie aus Tabelle V S. 21 zu entnehmen ist, weichen die Resultate von 4 Wertepaaren (*) im Gegensatz zu denen der übrigen Wertepaare extrem voneinander ab und so habe ich diese 4 Ergebnisse nicht in meine Berechnungen für die Korrelation zwischen beiden Methoden einbezogen. Welche Gründe kann es haben, daß mit der acetylierenden radioenzymatischen Methode ein völlig anderer Spiegel gemessen wird als mit dem Mikrotitertest? Möglicherweise ist zusätzlich zum Aminoglykosid Chloramphenicol appliziert worden, was eine Erklär-

ung für den niedrigen Spiegel mit der enzymatischen Methode wäre, da der acetylierende radioenzymatische Test durch Chloramphenicol gestört wird. Es ist aber auch möglich, daß eine Verunreinigung beim Mikrotiter-Test vorliegt bzw. am wahrscheinlichsten ist die Gegenwart eines zusätzlichen Antibiotikums, das den Teststamm ebenso beeinflußt hat, wie das zu ermittelnde Amikacin. Dieses Beispiel unterstreicht, wie wichtig es ist, alle in einer Probe vorhandenen Antibiotika zu kennen, um eventuelle Störfaktoren -bei der acetylierenden radioenzymatischen Methode ist es in der Regel Chloramphenicol, bei der Mikrotiter-Methode ein zusätzliches, unbekanntes Antibiotikum- eliminieren zu können. Welche Konsequenzen für die Therapie würden sich ergeben, wenn man mit der acetylierenden radioenzymatischen Methode einen niedrigsten Spiegel von 0,50 ug/ml ermittelt, mit dem Mikrotiter-Test aber einen niedrigsten Wert von 2,0 ug/ml erhält? Angenommen es handelt sich um ein Neugeborenes, das auf Grund einer Sepsis mit Gentamicin therapiert wird. Da in den ersten Lebenstagen die Leber- und Nierenfunktion noch nicht ausgereift ist, muß in der 1. Woche ein Dosierungsintervall von 12 Stunden gewählt werden, später sind es 8 Stunden. Wenn wir nun mit der enzymatischen Methode über mehrere Tage einen Minimalwert im Serum von 0,50 ug/ml messen, so werden wir unser Dosierungsschema beibehalten. Aber wenn wir wie mit der Mikrotiter-Methode für mehr als 10 Tage einen Minimalwert von 2 ug/ml und mehr ermitteln, so sollten wir daran denken, daß damit, besonders durch das Vorliegen einer relativen Niereninsuffizienz des Neugeborenen, ein erhöhtes toxisches Risiko für das Neugeborene gegeben ist und es ist angebracht, die Dosis zu reduzieren bzw. das Dosierungsintervall zu verlängern. Auf das hier angeschnittene Problem werde ich in einem späteren Abschnitt noch genauer eingehen. Die unerwartet gute Übereinstimmung zwischen der acetylierenden radioenzymatischen Me-

thode und dem Reihenverdünnungstest -es hat sich eine Korrelation von $r = 0,954$ ergeben- hängt sicher mit der Anzahl der vergleichbaren Wertepaare zusammen und auch damit, daß die meisten Wertepaare im Bereich zwischen 0,50 und 16 $\mu\text{g/ml}$ liegen, ein Bereich also in dem die Titerstufen der Verdünnungsmethode noch relativ eng beieinander liegen. Aus Tabelle V S.21 geht hervor, daß der prozentuale Unterschied zwischen den mit beiden Tests je einmal gemessenen Serumkonzentrationen durchschnittlich 31,42% beträgt und die Gleichung der Regressionsgeraden lautet: $y = 0,957x + 0,854$. Die Ergebnisse des Vergleichs zwischen beiden Methoden sind in Tabelle V S.21 zusammengefaßt, die Regressionsgerade findet sich auf S. 22 Abb. 6, wobei aus Tabelle V zu entnehmen ist, daß die Einzelkurven der summarischen Regressionsgerade entsprechen.

(3) Genauigkeit

Als nächstes habe ich zur Überprüfung der Genauigkeit eine Qualitätskontrolle mit Gentamicin und ein "Spiking Recovery" mit Sisomicin durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle VI bzw. VII S.23 zusammengefaßt sind. Im Rahmen einer Qualitätskontrolle habe ich 4 mir unbekannte Gentamicinproben mit der acetylierenden radioenzymatischen Methode bzw. mit der Mikrotiter-Methode je einmal bestimmt. Wie aus Tabelle VI S.23 hervorgeht, läßt sich für beide klinische Tests eine relativ gute Genauigkeit vermuten. Solche Qualitätskontrollen können von Zeit zu Zeit von Referenzlaboratorien durchgeführt werden, um die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der in den einzelnen Laboratorien üblichen Testverfahren bei der Bestimmung von Antibiotika-Spiegel zu überprüfen (für relevante Angaben aus England siehe Reeves & Bywater, 25). Eine Methode wird dann als gut bezeichnet, wenn 19 von 20 Bestimmungen in einem Intervall von $\pm 25\%$ um den wahren Wert liegen. Bei den in England durchgeführten Qualitätskontrollen (25) haben sich Röhrchenverdünnungsmethoden als relativ ungenau erwiesen und die acetylierende radioenzymatische Methode

wird auf Grund ihrer großen Genauigkeit seither bevorzugt zur Bestimmung von Aminoglykosiden herangezogen. Da die Ergebnisse meiner Qualitätskontrolle noch keine ausreichende Aussage über die Genauigkeit beider Tests erlauben, habe ich ein "Spiking Recovery" mit 2 Sisomicinsera durchgeführt. Bei der acetylierenden radioenzymatischen Methode ergibt sich eine Genauigkeit von $\pm 8\%$. Mit der Mikrotiter-Methode ergeben sich für dieselben Sera Konzentrationen von 10 ug/ml (enzymatischer Wert: 9,10 ug/ml) bzw. 8 ug/ml (enzymatischer Wert: 7,30 ug/ml), da der Verdünnungstest Konzentrationen zwischen zwei Stufen nicht erfassen kann und eine Genauigkeit von $\pm 34\%$ (= 2x Standardabweichung). Verdünnungsmethoden sind also wesentlich ungenauer als die acetylierende radioenzymatische Methode, die unter optimalen Voraussetzungen -dazu gehören u.a. standardisierte Reaktionsbedingungen und ein "gutes" Enzym- ein sehr genaues Erfassen der Serumkonzentration eines Aminoglykosids erlaubt.

(4) Reproduzierbarkeit

Bei der Beurteilung klinischer Tests stellt sich die Frage nach der Reproduzierbarkeit eines Testverfahrens. Zu diesem Zweck habe ich 3 Sisomicinstandards und 3 Patientensera an verschiedenen Tagen je einmal mit der acetylierenden radioenzymatischen Methode und dem Mikrotiter-Test bestimmt. Da die tatsächliche Konzentration der Patientensera nicht bekannt ist, sehe ich den Mittelwert meiner Sisomicinbestimmungen als den wahren Serumspiegel an. Als Anhalt für die 3 anderen zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit verwendeten Sera gelten die in gepooltem Humanserum hergestellten Sisomicinstandards. Um die Ergebnisse beurteilen und mit den Arbeiten anderer Autoren (3, 27), die ebenfalls Mehrfachbestimmungen vorgenommen haben, vergleichen zu können, habe ich wie diese der Auswertung die Statistik von Reeves & Bywater (25) zugrunde gelegt. Diese Statistik bezeichnet eine Methode dann als gut, wenn bei 95%-igen Vertrauensgrenzen die Abweichung des Meßwerts vom wahren Wert weniger als 25% beträgt. Wie aus Tabelle VIIb S.25 zu entnehmen

ist, erfüllt nur eine der von mir mit der 6'-N-Acetyltransferase durchgeführten enzymatischen Bestimmungen der 6 Testsera diese Bedingung nicht und zwar betrifft es das Patientenserum 1 mit einem Serumspegel von 1,05 ug/ml. Auch bei Shannon, Phillips (27) erwies sich die acetylierende radioenzymatische Methode bei Konzentrationen unter 2 ug/ml als relativ ungenau, was damit zusammenhängen kann, daß der Zählirrtum bei niedrigen Konzentrationen größer ist als bei hohen, denn das Verhältnis Counts pro Minute : Background Counts pro Minute wird bei niedrigen Serumsiegeln kleiner und damit erhöht sich der Zählirrtum. Je höher die Konzentration, um so besser ist die Reproduzierbarkeit der acetylierenden radioenzymatischen Methode. Das Ergebnis der Mehrfachbestimmungen hängt natürlich auch davon ab, wie sorgfältig die Standards hergestellt wurden und so zeigt sich bei einem Vergleich der von mir angesetzten Standards 2 und 4 ug/ml mit Standards von Shannon (27) und Broughall (3), die denselben Konzentrationsbereich umfassen, ihre größere Erfahrung bei der Herstellung von Standards. Doch auch meine Ergebnisse bestätigen, was bereits Shannon (27) und Broughall (4) fanden, nämlich daß bei Konzentrationen zwischen 2 und 12 ug/ml eine gute Reproduzierbarkeit der acetylierenden radioenzymatischen Methode vorhanden ist.

Wie verhält es sich mit der Reproduzierbarkeit beim Mikrotiter-Test? Bei Konzentrationen unter 1 ug/ml ist er zwar "genauer" (35,14% Abweichung vom wahren Wert) als die acetylierende radioenzymatische Methode (37,42% Abweichung vom wahren Wert), jedoch erfüllt der Mikrotiter-Test bei keiner der Mehrfachbestimmungen das Kriterium von Reeves & Bywater (27). Vielmehr ist die Verdünnungsmethode als "schlecht" (Abweichung vom wahren Wert 26-50 %), ja sogar als "stark irreführend" (Abweichung vom wahren Wert über 50%) zu bezeichnen.

Aus Tabelle VIII a S.24 ist der Variationskoeffizient zu entnehmen. Er stellt ein relatives Maß für die Streuung dar und bestätigt die gute Reproduzierbarkeit der acetylierenden

radioenzymatischen Methode.

(II) Qualitative Auswertung

(1) Empfindlichkeit

Unter der Empfindlichkeit eines Tests verstehen wir seine Fähigkeit, die niedrigste Konzentration, die sich in einer Probe finden kann, erfassen zu können. Beide Methoden können Aminoglykosid-Spiegel um 0,50 ug/ml messen, was diese Tests zur Erfassung von "Vor-Gabe-Spiegeln" geeignet erscheinen läßt, die ja bei intakter Nierenfunktion häufig unter 1,50 ug/ml liegen. Bei den zur Bestimmung der Aminoglykoside üblichen Testverfahren muß man nicht nur eine ausreichende Empfindlichkeit für die therapeutische Breite fordern, sondern gerade im Bereich niedriger Konzentrationen ist eine ausreichende Empfindlichkeit von Bedeutung, da man festgestellt hat, daß die Toxizität dieser Chemotherapeutika insbesondere bei einer Niereninsuffizienz mehr mit dem niedrigsten als mit dem Spitzenwert korreliert. So haben Mawer et al. (16) gezeigt, daß bei einer Baseline Area -diese entspricht der Gesamtfläche, die die Konzentrationskurve mit der Zeitachse umschließt- über 45 mg Tage/l 4 von 5 Patienten, die mit Gentamicin behandelt wurden, ototoxische Schäden entwickelten, aber bei einer Baseline Area unter 45 mg Tage/l wurde nur 1 von 20 Patienten geschädigt. Wenn ein Aminoglykosid über mehrere Tage appliziert werden muß, so ist vor allem beim Vorliegen einer Niereninsuffizienz ein Ansteigen des niedrigsten Wertes möglich und damit erhöht sich die Gefahr toxischer Nebenwirkungen. Aus diesen 2 klinischen Gründen -(1) die Toxizität eines Aminoglykosids kann nicht nur mit dem Spitzenwert korrelieren, sondern auch mit einem erhöhten niedrigsten Serumspiegel, besonders wenn eine Einbuße der Nierenfunktion vorliegt. (2) Eine geringe Erhöhung des niedrigsten Wertes über mehrere Tage so wie dies unter einer langdauernden und

hochdosierten Therapie möglich ist, führt zu einem Ansteigen der Toxizität.- ist auch im Bereich niederer Serumspiegel eine ausreichende Empfindlichkeit wünschenswert und sollte bei der Wahl eines klinischen Tests zur Bestimmung von Aminoglykosiden berücksichtigt werden.

(2) Zeitaufwand, benötigte Serummenge pro Bestimmung

Um eine einzige Bestimmung durchzuführen, benötigt man für den Mikrotiter-Test 81 ul Patientenserum, für die acetylierende radioenzymatische Methode nur 15 ul bzw. bei Doppelbestimmungen 30 ul Serum. Dies ist von großem Vorteil bei pharmakokinetischen Studien, bei denen häufiger Blut abgenommen werden muß und auch bei Neugeborenen, denen nicht mehr als 1-2 Kapillaren voll Blut von der Fingerspitze oder Ferse genommen werden muß, um eine Menge von 30 ul Serum für eine Antibiotika-Bestimmung zu erhalten. Innerhalb von 2-3 Stunden weiß dann der behandelnde Arzt, ob er eine adäquate Dosis appliziert hat oder ob er diese entsprechend variieren muß. Diese Geschwindigkeit ist besonders wertvoll bei akutem oder auch bei chronischem Nierenversagen, das z.B. durch eine gram-negative Sepsis bedingt ist, wobei es einmal darum geht, genügend Aminoglykosid zur Bekämpfung der Sepsis zu applizieren und zum Anderen ist eine Kontrolle vom Verlauf des Antibiotika-Spiegels im Serum dringend erforderlich, um eine Kumulation des Chemotherapeutikums im Organismus rechtzeitig zu erkennen und die Therapie darauf abzustellen. Wenn es erforderlich ist, kann die enzymatische Bestimmung sogar wiederholt werden, da die meisten Aminoglykoside bei uneingeschränkter Nierenfunktion normalerweise alle 8-12 Stunden gegeben werden und ein enzymatischer Test innerhalb von 2 Stunden durchzuführen ist. Im Gegensatz dazu müssen Mikrotiterplatten über Nacht inkubiert werden und das Ergebnis liegt erst am nächsten Tag vor. Bei nicht schwerkranken Patienten oder unkomplizierten Fällen ist dies adäquat, aber bei akuten Sepsisfällen und Nierenversagen kann es -da sich der Zustand des Patienten

u.U. stündlich ändert- für eine sinnvolle Therapie zu spät sein. Ich habe versucht bei der acetylierenden radioenzymatischen Methode die Inkubationszeit zu verkürzen, um die Resultate der Antibiotika-Spiegel noch schneller zu erhalten. Es hat sich jedoch gezeigt -siehe Abb. 7 S. 26-, daß die Counts pro Minute nach 30 Minuten Inkubation am höchsten sind und so habe ich diese Zeit für die Inkubation beibehalten.

(3) Spezifität

Bei der acetylierenden radioenzymatischen Methode interferieren die meisten Antibiotika nicht, außer Aminoglykoside, die vom gleichen Enzym acetyliert werden und Chloramphenicol, das ebenfalls durch eine Acetyltransferase inaktiviert wird. Ich möchte an dieser Stelle auf die Arbeit von Lietmann (13) hinweisen, der Chloramphenicol-Bestimmungen mit einer Acetyltransferase ähnlich unserem enzymatischen Verfahren durchgeführt hat, wobei er ebenfalls ^{14}C -AcetylCoA als Donor der markierten Acetyl-Gruppe verwendet hat und die Aktivität des entstehenden Produkts ^{14}C -Acetoxy-Chloramphenicol nach der Extraktion in Benzin bestimmt hat. Bereits Stevens & Young (32) haben auf die Beeinflussung der acetylierenden radioenzymatischen Methode durch Chloramphenicol hingewiesen, nämlich daß bei einer Amikacinkonzentration zwischen 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ und einer im gleichen Serum vorhandenen Chloramphenicol-Konzentration zwischen 10 und 20 $\mu\text{g/ml}$ der mit der acetylierenden radioenzymatischen Methode bestimmte Amikacinspiegel um 30% und mehr zu niedrig liegt. Wenn also in einem Serum gleichzeitig Amikacin und Chloramphenicol enthalten ist, sollte man daran denken, daß durch kurz zuvor oder gleichzeitig appliziertes Chloramphenicol (Halbwertszeit $t/2$ 3-5 Stunden, bei Neugeborenen wegen der unreifen Leber- und Nierenfunktion über 24 Stunden) das enzymatische Ergebnis negativ beeinflusst wird und man sollte zur Bestimmung des Aminoglykosid-Spiegels eine mikrobiologische Methode wie z.B. den Mikrotiter-Test heranziehen, die durch die Wahl eines selektiv

resistenten Stammes durch Chloramphenicol nicht gestört wird. Auch lipidreiche Sera sollen die enzymatisch ermittelten Werte verfälschen. So ergaben sich bei den von Shanson und Hince (26) mit einer Plattendiffusion und der acetylierenden radioenzymatischen Methode durchgeführten Aminoglykosid-Bestimmungen in Seren von Patienten, die Lipidlösungen erhielten, für letzteren Test höhere Resultate. Broughall und Reeves (4) vermuten, daß die Lipide sich fest an das bei der Acetyltransferase Methode verwendete Phosphozellulosepapier heften und es erschweren, markiertes AcetylCoA, das nicht reagiert hat, wegzuwaschen.

Der Mikrotiter-Test ist wie alle mikrobiologischen Methoden unspezifisch, da er nur die allgemeine Aktivität der Probe erfaßt. Man muß also im voraus wissen, ob außer dem zu bestimmenden Aminoglykosid noch ein anderes Antibiotikum im Serum ist, da dieses ebenso einen Einfluß auf den Teststamm hat wie das zu ermittelnde Aminoglykosid. Das zusätzlich vorhandene Antibiotikum wird entweder inaktiviert oder man wählt einen Teststamm, der selektiv resistent ist, wobei man allerdings sehr aufpassen muß, daß kein ungeklärter Synergismus vorhanden ist. Wenn sich nur ein Chemotherapeutikum im Serum findet, so werden mit einer mikrobiologischen Methode das antimikrobiell aktive Antibiotikum und eventuelle, antimikrobiell aktive Metabolite erfaßt, aber antimikrobiell inaktive Abbauprodukte beeinflussen den Test nicht. Im Gegensatz dazu erfassen nicht-mikrobiologische Methoden auch nicht antimikrobiell aktive Metabolite und täuschen damit eine höhere antimikrobielle Wirksamkeit des Antibiotikums vor als es in Wirklichkeit zutrifft. Die Aminoglykoside unterliegen bekanntlich keinem Metabolismus und so wird mit der acetylierenden radioenzymatischen Methode genau wie mit dem Mikrotiter-Test die antimikrobielle Aktivität des unveränderten Antibiotikums bestimmt. Grundsätzlich ist es jedoch angebracht, mikrobiologische Methoden zur Kontrolle nicht-mikrobiologischer Methoden heranzuziehen, da Erstere die

eigentliche antimikrobielle Aktivität eines Chemotherapeutikums erfassen.

(4) Vielseitigkeit der Methoden

Beide Methoden sind zur Ermittlung von Aminoglykosid-Konzentrationen im Serum und anderen Körperflüssigkeiten geeignet. Ich selbst habe mit der acetylierenden radioenzymatischen Methode Liquor-, Eiter- und Urinbestimmungen vorgenommen und Furger, Russi, Kayser (7) haben gezeigt, daß kein Unterschied zwischen Serum- und Plasma-Bestimmungen zu finden ist, wobei sie das Plasma aus heparinisiertem Kapillarblut gewonnen haben. Heparin hat also keinen Einfluß auf die enzymatische Bestimmung. Bei der Messung von Aminoglykosiden in anderen Körperflüssigkeiten als dem Serum ist darauf zu achten, die Standards in derselben Flüssigkeit anzusetzen bzw. in einer Pufferlösung, die in ihrer Zusammensetzung etwa der Körperflüssigkeit entspricht.

(III) Noch ungeklärte Fragen

(1) Indikation für Aminoglykosid-Bestimmungen

Zunächst einmal ist zu klären, welche klinischen Umstände eine Aminoglykosid-Bestimmung erforderlich machen. Hierfür lassen sich 3 wichtige Gründe finden:

(a) An erster Stelle ist das Vorhandensein einer Niereninsuffizienz zu nennen. Da Aminoglykoside ausschließlich glomerulär filtriert werden, verlängert sich bei einem niereninsuffizienten Patienten die Halbwertszeit dieser Chemotherapeutika, es kommt zu einem erhöhten Blut- bzw. Gewebespiegel, der für den Patienten gefährlich werden kann. Im Rahmen einer Niereninsuffizienz kommt es nicht selten zu Verschiebungen im Wasserhaushalt und damit zu einer Veränderung des Verteilungsvolumens, was die Blutspiegelkurve nach oben oder unten rutschen läßt. Auch können Veränderungen in der Zusammensetzung der Blutbestandteile wie Anämie und Albuminurie als Folge einer Niereninsuffizienz

auftreten und die Pharmakokinetik eines applizierten Chemotherapeutikums beeinflussen. Die Aminoglykosid-Konzentration im Serum ist u.a. auch vom Lebensalter, der Körperoberfläche und dem Gewicht des Patienten abhängig. Für Erwachsene gibt es das Schema von Gingell & Waterworth -siehe S.56 im Anhang-, das eine Orientierung hinsichtlich der Dosierungsintervalle bei normaler Dosgabe bei einem niereninsuffizienten Patienten erlaubt, oder aber man zieht ein Nomogramm (16) -siehe Anhang S.57 - heran, das auf Grund der Kreatininclearance oder des Serumkreatinins die Anfangsdosis, Erhaltungsdosis und das Dosierungsintervall entsprechend der Schwere der Niereninsuffizienz festlegt. Diese Nomogramme sind aber nicht für Neugeborene anwendbar. Da jedoch eine Neugeborenen-Sepsis bei Risikokindern relativ häufig auftreten kann, in 75% der Fälle gram-negative Keime die Erreger sind, die Aminoglykosid-Antibiotika nur eine geringe therapeutische Breite haben und gerade durch die relative Niereninsuffizienz der Neugeborenen auch über eine Erhöhung des Niedrigst-Spiegels ein erhöhtes toxisches Risiko gegeben ist, ist es wünschenswert, daß wir mit einer zuverlässigen Schnellmethode wie der acetylierenden radioenzymatischen Methode eine ständige Kontrolle der Serum-Spiegel dieser Antibiotika durchführen, um das Neugeborene vor möglichen Schäden zu bewahren.

(b) Auf Aminoglykoside kann heute bei der Bekämpfung einer septischen Infektion oder bakteriellen Meningitis bei Neugeborenen und Säuglingen nicht verzichtet werden, wobei sie häufig mit Penicillinen kombiniert werden, um die additive Wirkung dieser Antibiotika auszunutzen. Eine weitere Indikation für die Kontrolle der Aminoglykosid-Spiegel stellen also schwere Infektionen dar und besonders wenn Verdacht auf ein septisches Geschehen gegeben ist, muß frühzeitig und nochdosiert behandelt werden, um das Leben des Patienten zu retten. Auswirkungen möglicher toxischer Schädigungen spielen in diesem Fall eine untergeordnete Rolle.

(c) Auch eine hochdosierte und vor allem langdauernde Therapie wie z.B. bei der Endokarditis macht Aminoglykosid-Bestimmungen erforderlich. Denn sowohl hohe Serumspitzen als auch eine Behandlung über mehrere Tage führt über einen erhöhten niedrigsten Serumspiegel zu einer erhöhten toxischen Gefährdung des Patienten.

(2) Schwierigkeiten beim Mikrotiter-Test

Beim Mikrotiter-Test stehen folgende Schwierigkeiten im Vordergrund, wobei die ersten beiden für alle mikrobiologischen Methoden zutreffen:

(a) Es ist steriles Arbeiten erforderlich.

(b) Geringe Spezifität der mikrobiologischen Methoden:

Reeves, Holt (24) haben mehrere Sera mit "bekannten" Antibiotika elektrophoretisch aufgetrennt und in 20-30% der Fälle fanden sie noch zusätzliche, dem Labor nicht gemeldete Antibiotika im gleichen Serum. Zusätzlich applizierte Chemotherapeutika beeinflussen den Test natürlich ebenso wie das zu bestimmende Aminoglykosid. Nur wenn bekannt ist, welche Medikamente sich zusätzlich in der zu bestimmenden Probe finden, kann das zweite Antibiotikum möglicherweise inaktiviert werden oder man verwendet einen Teststamm, der empfindlich gegenüber dem Aminoglykosid und resistent gegenüber dem zweiten Chemotherapeutikum ist.

(c) Die Verdünnungen können aus arbeitstechnischen Gründen nicht zu eng gewählt werden und Konzentrationen zwischen zwei Titerstufen werden nicht erfaßt.

(d) Die Ergebnisse der Mehrfachbestimmungen von Tabelle VIII S.24 haben gezeigt, daß der Reihenverdünnungstest besonders im Bereich hoher Konzentrationen viel ungenauer als die radioenzymatische Methode ist, was auch zu erwarten war, da in diesem Bereich die Titerstufen relativ weit auseinander liegen. K. Unertl, F.D.Daschner, W.Marget (35) haben gezeigt, daß bei einem Verdünnungsfaktor von 1:1,33 bzw. 1:1,5 die Genauigkeit der Mikrotiter-Methode etwas besser ist als bei einem Verdünnungsfaktor

von 1:2. Eine andere Möglichkeit, die Genauigkeit des Mikrotiter-Tests, bei dem die einzelnen Stufen in der Regel 1:2 verdünnt sind -so wie es auch bei meiner Vergleichsstudie der Fall war- , im Bereich hoher Konzentrationen zu verbessern, könnte darin bestehen, von den "Nach-Gabe-Spiegeln" bzw. vom Serum eines niereninsuffizienten Patienten, in dem ein hoher Antibiotika-Spiegel zu erwarten ist, mehrere Verdünnungen herzustellen und anschließend die Konzentration des unverdünnten Serums und die der Verdünnungen zu bestimmen.

(e) Die lange Inkubationszeit kann ein weiteres Problem sein. Auch wenn der Arbeitsaufwand für eine Bestimmung nur 15-30 Minuten beträgt, so liegt das Ergebnis doch erst am nächsten Tag nach einer Bebrütungszeit von 14-16 Stunden vor, was für die Behandlung eines schwerkranken Patienten, der mit einem Vertreter der Aminoglykosid-Gruppe behandelt wird, nicht adäquat ist.

(3) Schwierigkeiten bei der acetylierenden radioenzymatischen Methode

(a) Einen Störfaktor der acetylierenden radioenzymatischen Methode stellt das Chloramphenicol dar und auch auf die Hemmung der enzymatischen Methode durch Seren von Patienten, die Lipidlösungen erhalten hatten (26), wurde bereits hingewiesen.

(b) Man muß mit einer mikrobiologischen Methode überprüfen, ob die mit der nicht-mikrobiologischen Methode gemessenen Antibiotika wirklich mikrobiologisch aktiv sind, denn mit einem nicht-mikrobiologischen Test wie der Acetyltransferase Methode werden auch mikrobiell inaktive Metabolite gemessen, die nicht für die Therapie relevant sind. Die Anwendung der acetylierenden radioenzymatischen Methode beschränkt sich also auf Medikamente, bei denen Metabolite keine Rolle spielen, was ja für die Aminoglykosid-Antibiotika zutrifft.

(c) Es herrschen sehr unterschiedliche Auffassungen darüber, welches der Verfahren zur Enzymherstellung -Ultraschall oder osmotischer Schock- geeigneter ist. Wegen technischer Schwierig-

keiten (z.B. zu hohe Temperaturen) hat sich das Ultraschall-Verfahren bei uns nicht bewährt und das Enzym wurde in der Regel mit Hilfe des osmotischen Schocks hergestellt.

(d) Es ist sorgfältiges pipettieren erforderlich, da es sich bei der geringen Menge von 15 μ l Serum pro Röhrchen schon bemerkbar macht, wenn nur einige Tropfen Serum in der Pipettenspitze bleiben.

Eine Zusammenfassung der quantitativen und qualitativen Auswertung des Vergleichs zwischen der acetylierenden radioenzymatischen Methode und dem Mikrotiter-Test findet sich in Tabelle IX S. 27.

(IV) Zusammenfassung der Diskussion

Nachdem wir nun die Vor- und Nachteile beider Methoden kennen, müssen wir abwägen, ob bzw. unter welchen Umständen einem der beiden Tests der Vorzug zu geben ist. Zuerst einmal sollte man sich überlegen, ob die Voraussetzungen für das Einsetzen der enzymatischen Bestimmung gegeben sind. Darunter verstehe ich, ob dem Labor ein Liquid Szintillation Counter (β -Zähler) zur Verfügung steht und wie häufig Aminoglykoside in der Klinik appliziert werden. Wenn sie nur gelegentlich in der Therapie eingesetzt werden, lohnt es sicher nicht, einen β -Zähler anzuschaffen und das sehr teure ^{14}C -AcetylCoA -50 μCi kosten etwa 800.-DM- zu kaufen. Man kann in diesem Fall statt der kostspieligen acetylierenden radioenzymatischen Methode den Mikrotiter-Test oder einen anderen in der Klinik üblichen mikrobiologischen Test als billige, einfache und zuverlässige Methode zur Bestimmung der Aktivität der Aminoglykoside heranziehen. Ist jedoch ein Beta-Zähler vorhanden, werden Aminoglykoside regelmäßig appliziert und gibt es in der Klinik Jemanden, der Erfahrung in der Herstellung von Enzymen hat, so würde ich die Mikrotiter-Methode als Ergänzung und ständige Kontrolle der nicht-mikro-

biologischen Methode heranziehen und der acetylierenden radioenzymatischen Methode den Vorzug geben, da sie eine relativ große Genauigkeit und gute Reproduzierbarkeit aufweist, das Resultat einer Spiegelbestimmung in ca. 2 Stunden vorliegen kann und nur eine geringe Serummenge pro Bestimmung erforderlich ist. Sicher wäre es sinnvoll und von großem Nutzen, die Bestimmung der Aminoglykoside zu zentralisieren, d.h. ein Zentrallabor ermittelt die Serumspiegel für alle anderen Kliniken. Dadurch entfallen für diese Kliniken die Kosten für das Material und den Liquid Szintillation Counter, im Zentrallabor findet sich Personal, das speziell mit der acetylierenden radioenzymatischen Methode und ihren eventuell auftretenden Schwierigkeiten vertraut ist und jeder Arzt, der einen Patienten mit einem Antibiotikum der Aminoglykosid-Gruppe behandelt, kann und sollte sich im Interesse seines Patienten an das Zentrallabor wenden, um den Serumspiegel innerhalb weniger Stunden bestimmen zu lassen und damit eine Kontrolle für eine adäquate Therapie zu haben.

(F) Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war ein Vergleich zwischen 2 zur Bestimmung von Aminoglykosid-Spiegeln geeigneten Methoden: dem Mikrotiter-Test und der acetylierenden radioenzymatischen Methode. Es galt festzustellen, in wieweit eine Korrelation zwischen beiden Methoden besteht, welche Genauigkeit und Reproduzierbarkeit dem jeweiligen Testverfahren zu eigen ist und beide Methoden sollten in Bezug auf ihre Empfindlichkeit, Geschwindigkeit und benötigtes Untersuchungsmaterial, Spezifität und klinische Verwendbarkeit geprüft werden.

Zur Beurteilung der Korrelation beider Methoden wurde in 44 Patientensera der Aminoglykosid-Spiegel mit der acetylierenden radioenzymatischen Methode und dem Mikrotiter-Test je einmal ermittelt und es ergab sich ein optimaler Korrelationskoeffizient von $r=0,954$ und die Gleichung der Regressionsgeraden lautet: $y=0,957x + 0,854$.

Mit einer Qualitätskontrolle und einem "Spiking Recovery" wurde die Genauigkeit beider Testverfahren überprüft. Die Genauigkeit für den enzymatischen Test beträgt $\pm 8\%$, für den Mikrotiter-Test $\pm 34\%$.

Auch in Bezug auf die Reproduzierbarkeit -sie wurde an Hand von Mehrfachbestimmungen 6 verschiedener Sisomicinsera untersucht- zeigte sich die acetylierende radioenzymatische Methode dem Mikrotiter-Test überlegen.

Beide Methoden weisen eine ausreichende Empfindlichkeit auf und sind auch zur Bestimmung von Aminoglykosiden in anderen Körperflüssigkeiten als dem Serum geeignet.

Mikrobiologische Methoden wie der Mikrotiter-Test sind unspezifisch, da sie nur die allgemeine antimikrobielle Aktivität der Probe erfassen und man daher, falls ein zusätzliches Antibiotikum im Serum vorhanden ist, versuchen muß, dieses zu inaktivieren oder einen selektiv resistenten Stamm zu wählen, wobei ein

ungeklärter Synergismus auszuschließen ist. Die acetylierende radioenzymatische Methode weist eine gute Spezifität auf und nur Chloramphenicol stellte sich als Störfaktor der enzymatischen Methode heraus. Da der acetylierende radioenzymatische Test zu den nicht-mikrobiologischen Methoden gehört, würde er bei der Messung der Aminoglykosid-Konzentration auch nicht antimikrobiell aktive Metabolite erfassen. Aminoglykosid-Antibiotika unterliegen jedoch keinem Metabolismus und so wird mit der mikrobiologischen und der nicht-mikrobiologischen Methode die Konzentration des unveränderten Aminoglykosids ermittelt.

Für eine enzymatische Bestimmung benötigt man 30 μ l Serum, für eine Bestimmung mit dem Mikrotiter-Test 81 μ l. Ein weiterer Vorteil der enzymatischen Methode ist ihre Schnelligkeit. So liegt bereits nach 2-3 Stunden das Ergebnis vor, bei der Verdünnungsmethode erst nach 14-16 Stunden Inkubation.

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es empfehlenswert, den Mikrotiter-Test als Ergänzung und ständige Kontrolle der acetylierenden radioenzymatischen Methode anzuwenden, während der Behandlung eines unter einem Aminoglykosid stehenden schwerkranken Patienten aber -falls in der Klinik die Möglichkeit dazu besteht- die acetylierende radioenzymatische Methode aufgrund ihrer Schnelligkeit, Genauigkeit und Spezifität heranzuziehen, um den Patienten an Hand der Serumspiegel adäquat therapieren zu können.

A N H A N G

Tabelle I

Einige der in der Klinik gebräuchlichen Aminoglykosid-Antibiotika

Antibiotikum	MGW Summenformel	Saccharid- struktur	Herkunft
Butirosin A und B	577,60 $C_{21}H_{43}N_5O_{12}$	Trisaccha- rid	Bacillus circulans (1972)
Gentamicine			
Gentamicin A	468,50 $C_{18}H_{36}N_4O_{10}$	Trisaccha- ride	Micromonospora purpurea (1962)
B	482,53 $C_{19}H_{38}N_4O_{10}$		Micromonospora echinospora
B ₁	496,56 $C_{20}H_{40}N_4O_{10}$		Micromonospora carbonacea
C ₁	477,60 $C_{21}H_{43}N_5O_7$		Micromonospora halophytika
C _{1a}	449,55 $C_{19}H_{39}N_5O_7$		
C ₂	463,58 $C_{20}H_{41}N_5O_7$		
X	482,53 $C_{19}H_{38}N_4O_{80}$		
Kanamycine			
Kanamycin A	484,50 $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$	Trisaccha- ride	Streptomyces kanamyceticus (1957)
B	483,52 $C_{18}H_{37}N_5O_{10}$		Streptomyces takakuraensis
C	484,50 $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$		
Amikacin	585,61 $C_{22}H_{43}N_5O_{13}$		
Lividomycin	761,78 $C_{29}H_{55}N_5O_{18}$	Pentasac- charid	Streptomyces lividus

Antibiotikum	MGW	Saccharid- struktur	Herkunft
	Summenformel		
Neomycine			Streptomyces
Neomycin A	322,36 $C_{12}H_{26}N_4O_6$	Disaccharid	fradiae (1949)
B	614,67 $C_{23}H_{46}N_6O_{13}$	Tetrasaccha- rid	(1950)
C	614,67 $C_{23}H_{46}N_5O_{13}$	Tetrasaccha- rid	(1951)
Paromomycine			
Paromomycin I	615,65 $C_{23}H_{45}N_5O_{14}$	Tetrasaccha- ride	Streptomyces rimo- sus forma paromo- mycinus (1953)
II	615,65 $C_{23}H_{45}N_5O_{14}$		Strept. catenulae, chrestomyceticus, albus fradiae
Sisomicin	482,53 $C_{19}H_{38}N_4O_7$	Trisaccha- rid	Micromonospora inyoensis (1970)
Spectinomycin	332,35 $C_{14}H_{24}N_2O_7$	Disaccharid	Streptomyces spec- talis (1961), flavo- persicus
Streptomycine			
Streptomycin A	581,58 $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$	Trisaccharid	Streptomyces gri- seus (1944)
B	743,75 $C_{27}H_{49}N_7O_{13}$	Tetra- saccharid	Streptomyces gri- seus (1947)
Oxystrepto- mycin	597,58 $C_{21}H_{39}N_7O_{13}$	Trisaccharid	Streptomyces gri- seus carneus (1949)
Tobramycin	341,31 $C_{18}H_{37}N_5O_9$	Trisaccharid	Streptomyces tenebrarius (1967)

Tabelle II

Gemeinsame Eigenschaften der Aminoglykoside

Hauptvertreter

Kanamycingruppe: Kanamycin A, B, C; Gentamicin A, C₁, C_{1a}, C₂;
Tobramycin, Sisomicin, Amikacin

Neomycingruppe: Neomycin B, C; Lividomycin A, B; Paromomycin
Streptomycingruppe

Anmerkung: Abkömmlinge von Streptomyces-Arten sind durch ein
y in der Schreibweise erkennbar, Produkte von Monospora-Arten
durch ein i.

Chemie

basische Oligosaccharide

gemeinsamer Bestandteil im Molekül der Aminoglykoside:

Streptamin oder Abwandlungen, besonders 2-Desoxystreptamin

Wirkungsspektrum

breit, vor allem gegenüber gram-negativen Keimen

Wirkungstyp

bakterizid

Wirkungsmechanismus

Beeinflussung der bakteriellen Proteinsynthese mit ribosomalem
Angriffspunkt

Pharmakokinetik

nach oraler Gabe keine Resorption

rasche Resorption nach i.m. Gabe

kein Metabolismus

Eiweißbindung 0-30 %

Ausscheidung über die Niere durch glomeruläre Filtration

Nebenwirkungen

Ototoxizität, Nephrotoxizität, neuromuskuläre Blockade, aller-
gische Überempfindlichkeit z.B. in Form der Eosinophilie oder
mit entsprechenden Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System

Resistenz

Inaktivierung des Moleküls durch Phosphorylierung, Adenylylier-
ung und Acetylierung

Parallelresistenz unterschiedlicher Ausprägung innerhalb der
Gruppe: "Durch die an Plasmide in verschiedener Qualität gebun-
denen enzymatischen Aktivitäten und deren spezifischen -teilweise
kongruenten- Haftstellen an bestimmten Aminosuktern der einzelnen
Aminoglykoside und auf Grund molekular-struktureller Gemeinsam-
keiten sind Parallelresistenzen unterschiedlicher Ausprägung mög-
lich." (Zitat nach Heilmeyer, Antibiotika-Fibel)

Tabelle III

In der Klinik übliche Methoden zur Bestimmung von Aminoglykosiden

(I) Mikrobiologische Methoden

(1) Agardiffusionstest

Vertikale Diffusion

(2) Reihenverdünnungs-Methoden

Mikrotiter-Test

(3) Urease-Methode

(II) Nicht-Mikrobiologische Methoden

(1) Radio-Immun Assay

(2) Enzymatische Methoden

Phosphorylierung

Adenylylierung

Acetylierung

(3) Immunfluoreszenz-Test

Abb.2a: Prinzip des Radio-Immun Assay

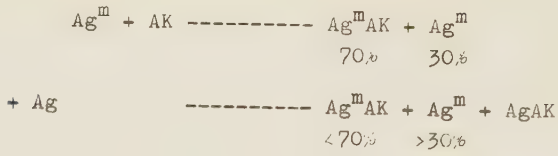


Abb.2b: RIA-Standardkurve für ^3H -Gentamicin (vgl. Mahon et al., Antimicrob.Ag.Chemother. 1973)

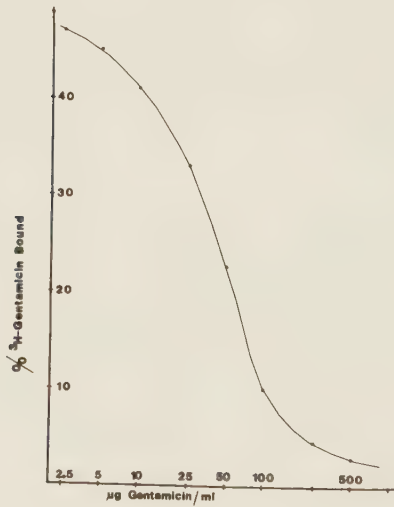


Abb.2c: RIA-Standardkurve für ^{125}J -Amikacin (eigene Werte)

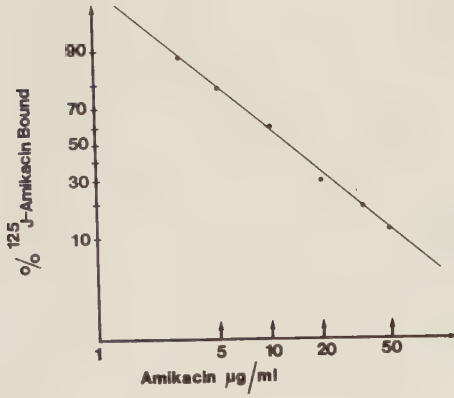


Tabelle IV

Aminoglykosid inaktivierende Enzyme

Phosphotransferasen

Phänotyp	Genotyp
KM, NM, RM, PM, LM	APH(3')-1
KM, NM, RM, PM, BT	APH(3')-2
RM	APH(5")
SM	APH(3")
SM	APH(6)

Adenylyltransferasen

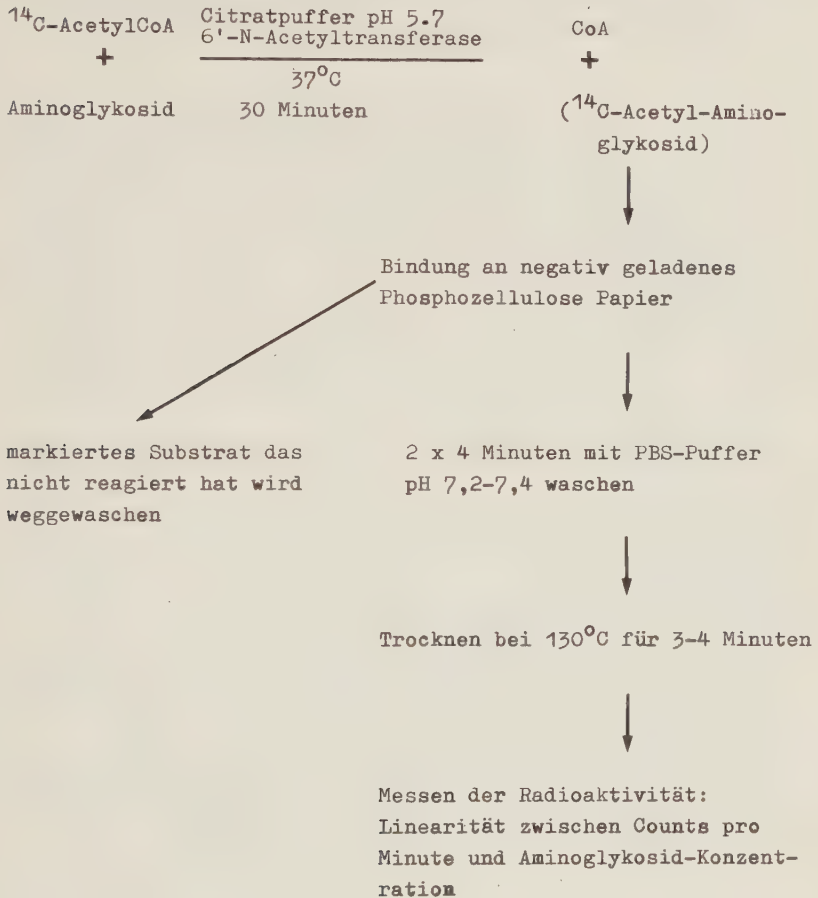
Phänotyp	Genotyp
SM	AAD(3")
SM	AAD(6)
GM, KM, DKB	AAD(2")

Acetyltransferasen

Phänotyp	Genotyp
KM-A, KM-B	AAC(6')-1
KM-A, KM-B, GM-C _{1a} , -C ₂	AAC(6')-2
KM-A, KM-B, GM-C _{1a} , -C ₂ , DKB	AAC(6')-3
KM-A, KM-B, GM-C _{1a} , -C ₂ , DKB, AK	AAC(6')-4
GM	AAC(2')-1
LM, RM, BT, GM, KM-B, -C, DKB, NM	AAC(2')-2
GM-C ₁ , -C _{1a} , -C ₂	AAC(3)

KM: Kanamycin; NM: Neomycin; RM: Ribostamycin; PM: Paromomycin;
 LV: Lividomycin; BT: Butirosin; SM: Streptomycin; GM: Gentamicin;
 DKB: 3',4'-Dideoxy-Kanamycin-B; AK: Amikacin (BB-K8)

Abb.3: Prinzip der acetylierenden radioenzymatischen Methode



Beschreibung der acetylierenden radioenzymatischen Methode, so wie sie zur Zeit in der Universitätskinderklinik München nach Optimisierung der Reaktionsbedingungen bei der Ermittlung der Aminoglykosid-Spiegel angewandt wird.

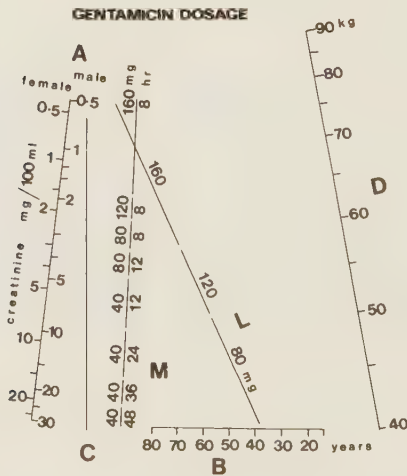
1. Röhrchen vorbereiten: 6 Standardröhrchen (1,0-2,5-5,0-10,0-20,0-40,0 ug/ml) und je 2 Röhrchen für das Serum vor bzw. nach Gabe.
2. 15 ul Standardlösung bzw. Patientenserum in jedes Röhrchen vorpipettieren.
3. Substratvolumen berechnen: ^{14}C : 10ul x (Anzahl d. Röhrchen - 2)
Enzymvolumen berechnen: E: 25ul x (Anzahl d. Röhrchen - 2)
 ^{14}C -AcetylCoA: das Lyophilisat mit 100 ul Citratpuffer
ph 5,7 versetzen; pro Röhrchen benötigt
man davon 10 ul
Substrat mit Enzym mischen
4. Vom Gemisch 35 ul in jedes Röhrchen geben und vorsichtig schütteln.
5. Für 30 Minuten im Wasserbad inkubieren.
6. Inzwischen Papiervierecke schneiden, beschriften und in den Ständer geben.
7. Nach der Inkubationszeit aus jedem Röhrchen 45 ul Material auf das entsprechende Papier pipettieren.
8. 2 x 4 Minuten waschen, um die überschüssige freie Aktivität zu entfernen.
9. Papiere für einige Minuten im Ofen trocknen lassen.
10. Papiervierecke abschneiden, in Szintillationsbehälter geben und die Radioaktivität für 1 Minute im Beta-Zähler messen.
11. Standardkurve aufstellen und Testwerte ablesen.

Abb. 8: Schema nach Gingell & Waterworth: Dosierungsintervall
bei normaler Dosisgabe beim Vorliegen einer Nieren-
insuffizienz

Harnstoff mMol/l	Kreatininclearance ml/Minute	Dosisintervall Stunden
6	70	8
8 - 16	30 - 50	12
35	5 - 10	48
Dialyse	3	1 Dosis nach jeder Dialyse

Abb. 9: Nomogramm nach Mawer¹⁶

1. Man verbinde durch eine Linie die Serulkonzentration von Kreatinin auf Skala A und das Alter auf Skala B. Man markiere den Schnittpunkt dieser Verbindungslinie mit Skala C.
2. Man verbinde mit einer Linie den Schnittpunkt von Skala C mit dem Körpergewicht auf Skala D. Man markiere die Schnittpunkte dieser Linie mit Skala L und M.
3. Auf Skala L ist die entsprechende Anfangsdosis zu entnehmen, auf Skala M die Erhaltungsdosis und das Dosierungsintervall.



Literaturverzeichnis

- (1) Benveniste, R., Davies, J.: Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *Ann. Rev. Biochem.* 42 (1973), 472-506
- (2) Berk, L.S., Lewis, J.L., and Nelson, J.C. (1974): One hour radio-immuno-assay of serum drug concentrations as exemplified by digoxin and gentamicin. *Clin. Chem.* 20, 1159
- (3) Broughall, J.M., Reeves, S.: The acetyltransferase enzyme methode for the assay of serum gentamicin concentrations and a comparison with other methods. *J. clin. Path.* (1976), 140-145
- (4) Broughall, J.M.: Assay Techniques for aminoglycoside antibiotics. Draft.
- (5) Broughten, A. and Strong, J.E.: Radioimmunoassay of iodinated gentamicin. *Clin. Chim. Acta*, 66, 125, (1976)
- (6) Froud, D.J.R.: Estimation of serum gentamicin levels. *Lancet* (1975/II), 1425
- (7) Furger, F., Russi, A., Kayser, F.H.: Schnellmethoden zur quantitativen Bestimmung von Aminoglykosid-Antibiotika. *Schweiz. med. Wschr.* 103, Nr. 21, (1973)
- (8) Gimarellou, H., Zimelis, V.M., Matulionis, D.O., Jackson, G.G.: Assay of aminoglycoside antibiotics in clinical specimens. *J. infect. Dis.*, Vol. 132, No. 4, October 1975
- (9) Haas, M., J., Davies, J.: Enzymatic acetylation as means of determing serum aminoglycoside concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 497-499, (1973)
- (10) Kayser, F.H.: Enzymatische Wertbestimmung von Aminoglykosid-Antibiotika. *Infection* 5 (1977)
- (11) Lewis, J.E., Nelson, J.C., Elder, H.A. (1972): Radioimmuno-assay of an antibiotic: gentamicin. *Nature, New Biology*, 239
- (12) Lewis, J.E., Nelson, J.C., Elder, H.A.: (1975), Amicacin: a rapid and sensitive radioimmunoassay. *Antimicrob. Ag. Chemo-ther.* 7, 42
- (13) Lietman, P.S., White, T.J., William v. Shaw: Chloramphenicol:

- an Enzymological Microassay. Antimicrob.Ag.Chemother., Aug.76, 347-353
- (14) Lüthy,R: Aminoglykosid-Bestimmungen im Serum mit der Urease-Methode. Infection 5 (1977), Nr. 2
 - (15) Mahon,W.A.,Ezer,J.,Wilson,T.W.(1975): Radioimmunoassay for measurement of gentamicin in blood. Antimicrob.Ag. Chemother. 3, 585
 - (16) Mawer,G.E.,Ahmad,R.,Dobbs,S.M.,Mc Gough,J.G.: Prescribing Aids for Gentamicin. Br.J.clin.Pharmac.(1974),1,45-50
 - (17) Mitchison,D.A.,Spicer,C.C.: A methode of estimating streptomycin in serum and other body fluids by through agar enclosed in glass tubes. J.gen.Microbiol.3,184, (1949)
 - (18) Noone,P.,Pattison,J.R.,Samson,D.: Simple,rapid method for the assay of aminoglycoside antibiotics.Lancet 1971/II, 16-19
 - (19) Noone,P.,Pattison,J.R.,Slack,R.C.B.: Rapid assay of gentamicin. Lancet (1972/II), 1194-1195
 - (20) Noone,P.,Pattison,J.R.: Methods for measuring serum gentamicin concentrations. J.clin.Path.28,1975,83-84
 - (21) Nossal,N.G.,Heppel,L.A.: The release of enzymes by osmotic shock from E.coli in the exponential Phase. J.biol.Chem. 241, 3055-3063, (1966)
 - (22) Phillips,I.,Warren,C.,Smith,S.E.: Serum gentamicin assay: a comparison and assessment of different methods. J.clin. Path. 27, 447-451, (1974)
 - (23) Reeves,D.S.: Accuracy of gentamicin assays. Postgraduate Medical Journal, 1974, 50 (Suppl.7), 20-21
 - (24) Reeves,D.S.,Holt,H.A.: Resolution of antibiotic mixtures in serum samples by high voltage electrophoresis. J.clin. Path. 28, 435, (1975)
 - (25) Reeves,D.S.,Bywater: Quality control of serum gentamicin assay experience of national surveys. J.of Antimicrob. Chemother. (1975), 1, 103-116

- (26) Shanson,D.C.,Hince,C.,Daniels,J.V.: Assay of gentamicin and tobramycin by a reliable 2 1/2 hour Klebsiella plate method. Chemother. In Proceedings of the 9th International Congress of Chemotherapy, 1975. Plenum Press, New York 1976, Vol. 2, pp 147-153
- (27) Shannon,K.P.,Phillips,I.: The use of 2'-N-Acetyltransferase for the assay of gentamicin in serum, plasma, and urine. J.antimicrob.Chemother. (1977), 3, 25-33
- (28) Smith,D.H.,Van Otto,B.,Smith,A.L.: A rapid chemical assay for gentamicin. New Engl.J.Med., 286, 583-586, (1972)
- (29) Stevens,P.,Young,L.S.,Hewitt,W.L.: ¹²⁵J-Radioimmunoassay of Amikacin and Comparison with a Microbioassay. J. of Antibiotics
- (30) Stevens,P.,Young,L.S.,Hewitt,W.L.: Radioimmunoassay, acetylating radioenzymatic assay, and microbioassay of gentamicin: a comparative study. J.Lab.Clin.Med.,Aug.75
- (31) Stevens,P.,Young,L.S.,Hewitt,W.L.: Improved Acetylating Radioenzymatic Assay of Amikacin, Tobramycin, and Sismicin in Serum. Antimicrob.Agents and Chemother., March 1975, 374-376
- (32) Stevens,P.,Young,L.S.,Hewitt,W.L.: Rapid assay of Amino-glycosides by Radioenzymatic Techniques.
- (33) Sonkren,P.E.,Ed. (1974): Radio-immunoassay and saturation analysis. Br.Med.Bull.,30
- (34) Ten Krooden,E.,Darrell,J.H.: Rapid gentamicin assay by enzymatic adenylylation. J.clin.Path. 27,452-456, 1974
- (35) K.Unertl.F.D.Daschner,W.Marget: A Semiautomatic Microtube Dilution Methode for Determing Antibiotic Blood Concentrations. Chemotherapy, 20, 331-338, (1974)
- (36) Watson,R.A.A.,Shaw,E.C.,Edwards,C.R.W.,Landon,J.: An ¹²⁵J Based Radioimmunoassay for Serum Gentamicin. Proc. IXth Internat.Cong.Chemother. July, 1975
- (37) Williams,J.D.,Andrews,J.,Gillette,P.: Analysis of Genta-

micin in plasma: A comparative study of four methods

Postgraduate Medical J., 1974, 50 (Suppl.7), 17-20

- (38) Susumu Mitsuhashi: Drug Action and Drug Resistance in Bacteria. 2. Aminoglycoside Antibioitics.

Herrn Professor Dr. W. Marget, Leiter der Abteilung für antimikrobielle Therapie der Universitätskinderklinik München, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für sein immer vorhandenes Interesse an meiner Arbeit und für die mit der Korrektur verbundene Mühe.

Besonders herzlich danke ich Herrn Dr. Wilkinson für seine große Hilfsbereitschaft und dafür, daß er mir bei der Durchführung der Experimente mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso gilt mein Dank Frau Flottau und Fräulein Olausson, beide medizinisch technische Assistentinnen des bakteriologischen Labors.

L E B E N S L A U F

Am 19.12.1953 wurde ich in München als erstes Kind des Diplom-Forstwirts Karlheinz Seibold und seiner Ehefrau Christl geboren.

Ich besuchte von 1960-1964 die Volksschule in Neubiberg und trat anschließend in das Städt. Luisengymnasium München ein. Dort legte ich im Mai 1973 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1973/74 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im August 1975 legte ich die ärztliche Vorprüfung, im August 1976 den ersten und im August 1978 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab. Im Oktober 1979 bestand ich den schriftlichen und im Dezember 1979 den mündlichen Teil des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung. Die Approbation als Arzt erhielt ich am 14.1.1980. Im Wintersemester 1976/77 bekam ich in der Haunerschen Kinderklinik München bei Herrn Prof.Dr.med. Marget eine experimentelle Doktorarbeit mit dem Thema: "Ein Vergleich von zwei verschiedenen Mikromethoden zur Bestimmung von Aminoglykosiden und ihre klinische Verwendung."

Ich strebe den Facharzt für Innere Medizin an und bin seit Mai 1980 in der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München tätig.

Christa Seibold

